Série A, N° 3.827
N° d'ordre : 4.678

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Paul JARRIGE

1re THÈSE :

PURIFICATION ET PROPRIETES DES SULFATASES DU SUC DIGESTIF D'HELIX POMATIA

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 10 mai 62 devant la Commission d'examen

M. LEDERER — Président
Mme CHAIX, M. TONNELAT — Examinateurs

IMPRIMERIE
R FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1962

Série A, N° 3.827
N° d'ordre : 4.678

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Paul JARRIGE

1re THÈSE :

PURIFICATION ET PROPRIETES DES SULFATASES DU SUC DIGESTIF D'HELIX POMATIA

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le devant la Commission d'examen

M. LEDERER Président
Mme CHAIX } Examinateurs
M. TONNELAT }

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1962

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE ...	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés
PRÉVOST	T	Chimie organique
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN ...	T	Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)
R. LUCAS	T	Recherches physiques
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC ...	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
J.-P. MATHIEU .	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Bénard	T	Chimie minérale
Buvat	T	Botanique (E.N.S.)
Dugué	T	Statistiques mathématiques
Soulairac	T	Psychophysiologie
Ulrich	T	Physiologie végétale
Maréchal	T	Optique théorique et appliquée
Kirrmann	T	Théories chimiques
Chadefaud ...	T	Botanique
Mlle Le Breton	T	Physiologie de la nutrition
Salem	T	Mathématiques générales
Lelong	T	Application de l'analyse à la géométrie
Devillers	T	Anatomie et Histologie comparées
Ehresmann ...	T	Topologie algébrique
Françon	T	Physique (S.P.C.N.)
Glangeaud	T	Géographie physique et Géologie dynamique
Godement	T	Mathématiques (M.P.C.)
Pisot	T	Technique Mathém. de la Physique
Roch	T	Géologie
Schatzman ..	T	Astrophysique
Termier	T	Paléontologie stratigraphique
Zamansky	T	Mathématiques générales
Lennuier	T	Physique (M.G.P.)
Rizet	T	Génétique (Orsay)
Routhier	T	Géologie appliquée
Mme Tonnelat.	T	Physique théorique
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C.)
Souchay	T	Chimie générale
Aigrain	T	Electrotechnique générale
Brusset	T	Chimie systématique
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme Chaix ..	T	Chimie biologique
Mme Hurel-Py.		Biologie végétale (P.C.B.)
Piaux	T	Chimie (M.P.C.)
Brun	T	Mécanique théorique des fluides
Lederer	T	Chimie biologique
Mme Dubreil .	T	Mathématiques (Agrég.)
Mme Lelong ..	T	Mathématiques (E.N.S.)
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.)
Cotte	T	Physique électricité
J.-E. Dubois ...	T	Chimie organique
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.)
André Michel .	T	Chimie minérale (Orsay)
Olmer	T	Energétique générale
Rouault	T	Electricité (Orsay)
Gauthier	T	Mécanique appliquée
Barchewitz ...	T	Chimie physique
Brossel	T	Physique atomique
Buser		Physiologie comparée
Camus		Physiologie végétale (B.M.P.V.)
Castaing	T	Physique (Orsay)
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay)
Noirot		Evolution des Etres org.
Pannetier	T	Chimie générale (Orsay)
Possompes	T	Zoologie
Pullmann	T	Chimie théorique
Teillac	T	Physique nucléaire et Radioactivité
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique
Ville	T	Econométrie
Willemart ...		Chimie (P.C.B.)
Dode	T	Chimie (Orsay)
Freymann	T	Recherches physiques
Guinochet	T	Biol. vég. S.P.C.N. (Orsay)
Rollet	T	Chimie (P.C.B.)
Mlle Josien ...	T	Chimie (S.P.C.N.)
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
Arnoult	T	Electronique (Orsay)
Chapelle	T	Physique (Orsay)
Delange	T	Mathématiques (Orsay)
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay)
Germain	T	Mécanique théorique des fluides
G. Lucas	T	Géologie
Allard	T	Chimie physique
Berthelot	T	Physique fondament. des hautes énergies (Orsay)
Bricard	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
Mme Albe-Fessard		Psychophysiologie
Friedel		Physique des Solides (Orsay)
M. Julia		Etudes des Moléculaires naturelles complexes
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N., Orsay)
Magat		Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin ..	T	Electrochimie
Monod	T	Chimie du métabolisme
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay)
De Possel	T	Analyse numérique
Charlot	T	Chimie analytique
Haïssinsky	T	Radiochimie
Lemée	T	Physiol. vég. B.M.P.V. (Orsay)
Guérin	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
M. Chatelet .		Chimie (P.C.B.)
Jean	T	Physique nucl. (Orsay)
Mattler	T	Physique S.P.C.N. (Orsay)
Louis Michel .		Phys. théor. des Hautes Energies (Orsay)
Bergerard		Zoologie (Orsay)
Bertein		Electronique (Orsay)
Bouissieres ...		Chimie des Radioéléments (Orsay)
Mme Couture .		Thermodynamique et Mécanique physique

Ellenberger ..		Géologie appliquée sur le terrain
Franc		Biologie animale (P.C.B.)
Schnell		Botanique tropicale (Orsay)
Stolkowski ...		Physiologie générale
Acher		Chimie biologique (Orsay)
Baudoin		Biologie animale (P.C.B.)
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.)
Blamont		Géophysique Ionosphère
Bourreau		Botanique
D. Curie		Physique (M.G.P.)
Durand-Delga .		Géologie
Freon	T	Chimie organ. (Orsay)
Heller		Physiologie végétale
Tortrat		Calcul des probabilités
Cailleux		Géologie (S.P.C.N.)
Magnan	T	Physique (S.P.C.N.)
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mme Choquet-Bruhat	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste
Mlle Veil		Physiologie générale
Lwoff	T	Microbiologie
Siestrunck ...	T	Mécanique physique et expérimentale
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires
Brochard	T	Physique P.C.B. (Orsay)
Cabannes	T	Mécanique générale
Lesieur	T	Mathématiques M.P.C. (Orsay)
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay)
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique
Comolet		Mécanique des fluides
Corabœuf		Physiologie animale
Delloue		Physique de l'exosphère
Gorenflot ...		Botanique II (Orsay)
Houillon		Biologie animale (P.C.B.)
J. Jullien		Chimie (P.C.B.)
Malgrange ...		Tech. math. de la Phys.
Olivier		Anthropologie
Nozeran	T	Botanique II (Orsay)
Blanc-Lapierre		Physique E.N.S. (Orsay)

Secrétaire général ..... R. Poullain

A MA FEMME

AUX MIENS

A MON MAITRE ET AMI

MONSIEUR LE PROFESSEUR M.-F. JAYLE

Professeur à la Faculté de Médecine

Qui m'a engagé à entreprendre ce travail et m'a constamment encouragé.

Qu'il trouve ici un témoignage de ma profonde admiration et de mon cordial attachement.

A J. YON

Maître de Recherches au C.N.R.S.

Dont l'aide et les conseils m'ont été si précieux.

Qu'elle veuille bien accepter mes vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur E. LEDERER

Qui a bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse, j'adresse mes remerciements pour la bienveillante attention avec laquelle il a examiné ce travail.

A Madame le Professeur P. CHAIX

Qui s'est vivement intéressée à cette étude et m'a incité à en développer certains aspects, je dis ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J. TONNELAT

J'exprime ma reconnaissance pour la sollicitude qu'il ma témoignée et les conseils qu'il m'a donnés.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538124_0037

INTRODUCTION

Le suc digestif d'*Helix pomatia* (SHP) contient de nombreux enzymes, des glucidases et des estérases en particulier. Nous avons proposé avec HENRY [56] son emploi pour hydrolyser les stéroïdes glucuro et sulfo-conjugués de l'urine. Nous y avons été conduits par le fait que l'hydrolyse de dérivés galacturoniques avait été réalisée par EHRLICH [36] et par COLLIN et LEMOYNE [13] avec ce suc. On savait, en outre, qu'il contient une phénolsulfatase. La β-glucuronidase a été mise en évidence dans des autolysats d'hépatopancréas d'*Helix laeda* par UTUSI, HUSI, MATUMOTO et NAGAOKA [111], cités par BILLETT [7], et sa présence confirmée par NAGAOKA [66], cité par DODGSON [18].

La séparation de la β-glucuronidase de la phénolsulfatase a été notre premier but. Au cours de ce travail, la diversité des sulfo-conjugués hydrolysés par le SHP a posé le problème de la multiplicité des sulfatases. L'obtention de fractions purifiées et la séparation des différentes sulfatases étaient à réaliser.

Le plan de cet exposé sera donc le suivant : après avoir passé en revue les méthodes de mesure des activités enzymatiques (*chapitre I*), nous décrirons successivement comment nous avons retiré les sulfatases du suc digestif d'*Helix* (*chapitre II*), comment nous les avons purifiées (*chapitre III*).

En possession des préparations purifiées, nous étudierons la cinétique de l'hydrolyse d'arylsulfates, de stéroïdes-sulfates dérivés de l'androstane, du prégnane (*chapitre IV*).

Des résultats obtenus, nous tirerons les conclusions et les hypothèses qui seront à vérifier.

Au cours de cet exposé, nous utiliserons les abréviations suivantes pour désigner les substrats et l'enzyme utilisé :

SUBSTRAT	NOM COMMUN	ABREVIATION
	Phénolphtaléine-glucuronidate⁻	P P G
	Phénolphtaléine disulfate⁻⁻	P P S
	Phénolphtaléine	P P
2-hydroxy 5-nitrophénylsulfate	Nitrocatéchol sulfate⁻⁻	N C S
2-hydroxy 4-nitrophénol	Nitrocatéchol	N C
Sulfate d'oestratriène 1,3,5(10) 3-yl 17-one	Oestrone sulfate⁻	O E S
Sulfate de 5α-androstane 3α-yl 17-one	Androstérone sulfate⁻	
Sulfate de 5α-androstane 3β-yl 17-one	Epiandrostérone sulfate⁻	
Sulfate d'androsta 5-ène 3β-yl 17-one	Déhydro-epiandrostérone sulfate⁻	D E A S
Androsta 5-ène 3β-ol 17-one	Déhydro-epiandrostérone	D E A
Disulfate d'androsta 5-ène 3β,17β-yl⁻⁻		
Sulfate de 5β-androstane 3α-yl 17-one	Etiocholanolone sulfate⁻	
Sulfate de 5β-androstane 3β-yl 17-one	3-Etiocholanolone sulfate⁻	
Sulfate d'androsta 4-ène 17β-yl 3-one	Testostérone sulfate⁻⁻	
Sulfate de 5α-androstane 17β-yl 3-one⁻		
Sulfate de 5α-pregnane 3α-yl 20-one⁻⁻⁻		
Sulfate de 5α-pregnane 3β-yl 20-one	Pregnanolone sulfate⁻	
Sulfate de pregna 5-ène 3β-yl 20-one	Pregnènolone sulfate⁻	
Sulfate de 5β-pregnane 3α-yl 20-one⁻		
Sulfate de pregna 4-ène 21-yl 3,20 dione	Désoxy-corticostérone sulfate⁻	
Sulfate de pregna 4-ène 21-yl 17α-ol 3,20 dione⁻		
Sulfate de pregna 4-ène 21-yl 17α-ol 3,11,20 trione	Cortisone 21-sulfate⁻	C O R S
Pregna 4-ène 17α,21 diol, 3,11,20 trione	Cortisone	C O R

E N Z Y M E	Suc digestif d'Helix Pomatia	S H P
S E L	de sodium	+
	de potassium	++
	de pyridinium	+++

TRAVAUX ANTERIEURS

En ce qui concerne directement notre sujet, la préparation et l'isolement des sulfatases du suc digestif d'*Helix pomatia* (SHP) hydrolysant les stéroïdes-sulfates, les travaux antérieurs sont peu nombreux. Depuis ces dernières années, les sulfatases que l'on trouve dans les règnes animal et végétal, ont donné lieu à de multiples travaux qui s'efforcent de les mettre en évidence, de les caractériser, de déterminer leur spécificité, leur rôle dans le métabolisme, mais peu de chercheurs ont tenté de les isoler ; c'est qu'en effet, elles se trouvent dans des liquides biologiques ou des tissus riches en protéines et sont accompagnées d'enzymes ayant des caractères très voisins. C'est pourquoi nous donnerons une classification des sulfatases afin de situer les produits qui font l'objet de cette étude, puis nous exposerons nos connaissances actuelles sur le SHP, matière première de notre travail.

LES SULFATASES

Les sulfatases sont des hydrolases qui catalysent la décomposition des esters-sulfates suivant la réaction :

$$R - O - SO_3^- + H_2O \longrightarrow R - OH + H^+ + SO_4^{2-}$$

où R est un radical alcoolique (alcoyl ou alkylsulfates) ou phénolique (arylsulfates).

La classification la plus récente des sulfatases donnée par Roy [92] est la suivante :

1° Arylsulfatases.
2° Stéroïdes-sulfatases.
3° Glucosulfatase.
4° Chondrosulfatase.
5° Myrosulfatase.
6° Alkylsulfatase.

Cette classification est provisoire, l'existence et la spécificité de certaines d'entre elles étant contestées.

1) ARYLSULFATASES

Elles hydrolysent les esters-sulfates de phénols. Elles ont été trouvées dans plusieurs microorganismes, dans les plantes supérieures et dans toutes les espèces animales étudiées.

Les substrats employés pour leur étude sont le p. nitrophénylsulfate (NPS) et le nitrocatéchol-sulfate (NCS).

On distingue deux types d'arylsulfatases d'après leur spécificité et leur comportement vis-à-vis des inhibiteurs :

	Type I	*Type II*
Affinité pour NPS	forte	faible
Affinité pour NCS	faible	forte
Inhibition par SO_4^{2-}	nulle	forte
Inhibition par PO_4^{3-}	nulle	forte
Inhibition par SO_3^{2-}	très forte	forte
Inhibition par CN^-	très forte	faible
Inhibition par F^-	faible	forte

Au type I appartiennent l'arylsulfatase d'*Aspergillus oryzae* étudiée par Neuberg et Kurono [70] et par C. Fromageot [43] : les arylsulfatases bactériennes, d'*Alcaligenes metalcaligenes* étudiée par Dodgson, Spencer et Williams [29, 30], d'*Aerobacter aerogenes* mise en évidence par Harada et Kono [52] ; les arylsulfatases C de foie de mammifères étudiées par Roy [87, 90] et par Dodgson [23, 24, 28].

Au type II appartiennent : les arylsulfatases A et B de foie de mammifères étudiées par Roy [86, 87] et par Dodgson [28].

Les arylsulfatases de mollusques représentent un type de transition et se rapprochent du type II.

Une seule arylsulfatase bactérienne, celle de *Proteus vulgaris,* purifiée par Dodgson [16] se rapprocherait de l'arylsulfatase B du foie. Chez les végétaux, dans les graines de moutarde noire, une arylsulfatase de type II a été mise en évidence par Baum et Dodgson [5].

Webb et Morrow [115, 116] ont fait des réserves sur la discrimination basée sur l'activité des arylsulfatases vis-à-vis de leurs substrats, les anions et en particulier l'ion Cl^- intervenant fortement sur cette dernière.

2) STEROIDES-SULFATASES

Les esters-sulfates de stéroïdes à fonction alcool sont hydrolysés par ces enzymes. Ceux-ci ont été mis en évidence dans le suc et les glandes digestives des mollusques :

— *Helix pomatia,* par Henry, Thévenet et Jarrige [54];

— *Patella vulgata*, par Stitch et Halkerston [105], et par Roy [88];

— *Otala punctata*, par Savar, Bagnoli et Dorfman [93];

— divers mollusques, par Leon, Bulbrook et Corner [60];

chez les mammifères :

— dans le foie de bœuf, par Gibian et Bratfish [46], et par Roy [91];

— dans le placenta, par Pulkkinen [81], qui a montré l'absence de stéroïde-sulfatase dans le fœtus et son apparition dans le foie du jeune rat âgé de un mois ;

— dans l'urine humaine, par Ammon et Ney [2].

Le substrat employé pour leur étude est le déhydroépiandrostérone sulfate (DHAS). Le pH optimum est 4.5 pour la stéroïde-sulfatase de mollusque [88], pH 8 pour la stéroïde-sulfatase de foie de bœuf [91]. pH 7,8 pour la stéroïde-sulfatase humaine [81].

La spécificité de la stéroïde-sulfatase de *Patella* et de foie de bœuf a été étudiée par Roy [88, 91]. Seuls sont hydrolysés les esters-sulfates de stéroïdes ayant leur fonction alcool en 3 β et dont le carbone 5 a la configuration 5 α ou Δ 5. Les esters-sulfates en 17 du 5 α ou 5 β-androstane et les esters-sulfates en 20 du 5 α ou du 5 β-pregnane ne sont pas hydrolysés.

Cependant le suc digestif d'*Helix pomatia* et les préparations obtenues à partir d'autres mollusques [60] hydrolysent aussi, quoique plus lentement, les esters-sulfates en 3 α ou 3 β du 5 β-androstane (α et β-étiocholanolone 3-sulfates). Le cortisone 21-sulfate est hydrolysé par *Patella* [88] et par *Helix pomatia* [17], alors qu'il n'est pas hydrolysé par la stéroïde-sulfatase de foie de bœuf [91]. Roy [88] a émis l'hypothèse que la glucose-sulfatase serait responsable de l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate. Dodgson [17] a montré que le suc digestif d'*Helix pomatia* ne contient pas de glucose-sulfatase et hydrolyse pourtant le cortisone 21-sulfate.

Les stéroïdes-sulfatases sont fortement inhibées par les sulfates, les phosphates, le fluorure. La stéroïde-sulfatase de foie de bœuf est peu sensible au fluorure.

3) GLUCOSULFATASE OU GLYCOSULFATASE

Elle hydrolyse le glucose 6-sulfate et les esters-sulfates d'osides de poids moléculaire peu élevé. Elle a été mise en évidence chez les mollusques :

— *Eulota*, par Soda et Hattori [99, 100, 101];

— *Charonia lampas*, par SODA [98], SUZUKI, TAKAHASHI et EGAMI [106], TAKAHASHI [107, 108];

— *Littorina littorea*, par DODGSON [17].

Elle est absente du suc digestif d'*Helix pomatia* (DODGSON [17]).

Elle existe chez les bactéries, d'après TANKO [110].

Une « cellulose-polysulfatase » hydrolysant le cellulose-polysulfate et le Charonin-sulfate a été mise en évidence dans le foie de *Charonia lampas*, par TAKAHASHI et EGAMI [108 *bis*].

4) CHONDROSULFATASE

Son existence fut envisagée par NEUBERG et RUBIN [71] constatant l'apparition de sulfate inorganique à partir de l'acide chondroïtine-sulfurique sous l'action des bactéries de la putréfaction.

NEUBERG et HOFMANN [69] obtinrent une préparation active à partir de *Pseudomonas eisenbergii*.

Sa présence a été démontrée chez les moisissures par PINCUS [80], chez les mollusques par DODGSON et SPENCER [26 *bis*].

En réalité, il existe une chondroïtinase à côté de la chondro-sulfatase. La chondroïtinase libère à partir du chondroïtine-sulfate des oligosaccharides-sulfates qui sont les substrats sur lesquels agit la chondrosulfatase. C'est ce qu'ont montré, sur *Proteus vulgaris*, DODGSON et LLYOD [19, 20]. La chondroïtinase a été séparée de la chondrosulfatase par DODGSON, LLOYD et SPENCER [21].

La chondroïtinase de *Proteus vulgaris* a été purifiée par NAKADA et WOLFE [67] sur diéthylamino-éthyl-cellulose. Ces auteurs ont montré que le disaccharide formé à partir du chondroïtine-sulfate est un disaccharide non saturé en α β par rapport à la fonction acide de l'acide glucuronique qui rentre dans sa constitution.

Les oligosaccharides-sulfates produits par l'action de l'hyaluronidase sont aussi hydrolysés par la chondrosulfatase, tandis que l'N-acétyl-galactosamine-sulfate et son dérivé diphosphouridinique qui entrent dans la constitution du chondroïtine-sulfate ne le sont pas (DODGSON, LLOYD et SPENCER [21].

La chondrosulfatase est fortement inhibée par les ions PO_4^{3-} et F^-.

5) MYROSULFATASE OU MYROSULFAMINASE

Elle libère les ions SO_4^{2-} à partir de la sinigrine ou myronate de K. Elle est présente chez les crucifères (NEUBERG et SHONEBECK [72]), dans les extraits de foie de *Charonia lampas* (SODA [98]; TAKAHASHI

[107]). Sa présence dans les tissus de mammifères (Neuberg et Wagner [74]) est mise en doute (Baum et Dodgson [5]).

L'existence même de la myrosulfatase est suspectée. La thioglycosidase provoquerait la rupture de la liaison glucidique, qui serait suivie d'un réarrangement de Lossen se manifestant par la libération d'ions SO_4^{2-} (Reese, Clapp et Mandel [82]).

6) ALKYLSULFATASE

Elle n'a jamais été isolée, mais on a des raisons de croire à son existence depuis que l'hydrolyse du sulfate de 2,4-dichlorophénoxyéthanol a été réalisée avec *Bacillus cereus mycoïdes* par Vlitos [112] et qu'*Aspergillus oryzae* a pu être cultivé avec le choline-0-sulfate, comme seule source de soufre par Egami et Itabashi [35].)

On pense qu'il existe aussi des N-sulfatases, amino-sulfatases ou sulfamidases, sulfatases capables de rompre la liaison sulfamate, depuis que Payza et Korn [78] ont obtenu la libération d'ions SO^{2}_{4} à partir de l'héparine avec des extraits de *Flavobacterium*.

LES SULFATASES DU SUC DIGESTIF D' « HELIX POMATIA »

La présence, chez différents genres d'escargots, de « phénolsulfatase » et de glucosulfatase était connue depuis les travaux de Soda et de son école. L'emploi du suc digestif d'*Helix pomatia* (SHP) comme agent d'hydrolyse des stéroïdes glucuro et sulfoconjugués urinaires a montré qu'il contenait d'autres sulfatases.

Sous l'action de ce suc, les œstrogènes étaient libérés, ainsi que le prégnandiol et les corticoïdes (Henry et Thévenet [53]). Une quantité connue de sulfate de déhydroépiandrostérone ajouté à une urine était totalement hydrolysé après incubation en présence de 1 % d'SHP. Seulement 5 % du stéroïde sulfate était hydrolysé si l'urine était, avant l'incubation, additionnée de 2 % de fluorure de sodium (Henry, Thévenet et Jarrige [54], Jayle et Baulieu [57]). Les auteurs précédents notaient qu'une fraction des 17-cétostéroïdes conjugués restait invariablement non hydrolysée après action du SHP. A côté de l'arylsulfatase doivent exister une stéroïde-sulfatase et une cortisone-sulfatase.

La stéroïde-sulfatase a une spécificité assez étroite puisque tous les stéroïdes-sulfates ne sont pas hydrolysés. Si les sulfates d'α et de β-étiocholanolone le sont peu, le sulfate d'androstérone ne l'est pas

du tout — comme le montrent Bloch et Gibree [8], Ammon et Ney [3], Leon, Bulbrook et Corner [60].

L'existence d'une cortisone-sulfatase est prouvée par Dodgson [17]. Roy [89] attribuait l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate à la glucose-sulfatase. Dodgson montre que le SHP ne contient pas de glucose-sulfatase et cependant hydrolyse le cortisone 21-sulfate.

Parmi ces sulfatases, seule l'arylsulfatase a été l'objet d'une étude approfondie.

Dodgson et Powell [22] fractionnent le SHP par l'acétone et le sulfate d'ammonium, mais préfèrent ensuite utiliser l'hépatopancréas pour la préparer. Ils donnent comme raison de leur choix la trop grande richesse en sucres du suc digestif.

Après élimination des acides nucléiques de l'homogénat d'hépatopancréas par le chlorure de manganèse, ils procèdent à un fractionnement par l'acétone et par le sulfate d'ammonium. Ils comparent l'activité des différentes fractions vis-à-vis du p.nitrophénylsulfate et du nitrocatécholsulfate. L'arylsulfatase de SHP se rapproche des arylsulfatases du type II, mais s'en distingue par la variation du pH optimum en fonction de la concentration en substrat et par l'absence d'activation par les ions Cl^-.

La stéroïde-sulfatase et la cortisone-sulfatase n'ont fait l'objet d'aucune tentative de purification. Les travaux mentionnés pour la stéroïde-sulfatase ont été effectués soit avec le suc brut, soit avec une poudre obtenue par précipitation acétonique, pour la cortisone-sulfatase avec la préparation d'arylsulfatase décrite plus haut.

L'étude de l'hydrolyse enzymatique des conjugués des stéroïdes urinaires comportait, pour apporter la preuve de leur glucuro ou de leur sulfoconjugaison, l'emploi de préparation exempte de β-glucuronidase. Ceci nous a conduit à étudier en même temps que la purification des sulfatases, le sort de la β-glucuronidase au cours du fractionnement du suc.

Ce bref rappel des propriétés du SHP nous fait déjà entrevoir la complexité de ce liquide biologique. Avant d'exposer nos essais de séparation des sulfatases, il nous faut d'abord indiquer les méthodes qui nous permettront de suivre, au cours de nos essais, le progrès de la purification. Cet exposé fait l'objet du chapitre premier.

Chapitre 1

MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Nous aurons besoin, dans la suite de ce travail, de déterminer la teneur de nos diverses fractions en :

1° β-glucuronidase.

2° Arylsulfatase.

3° Stéroïde-sulfatase.

4° Cortisone-sulfatase.

C'est pourquoi nous indiquerons ici les substrats sur lesquels nous ferons agir ces enzymes.

A. — SUBSTRATS

1° *Pour la β-glucuronidase*

Phénolphtaléine-glucuronidate de sodium (PPG)

Il est préparé, suivant Fishman, Springer et Brunetti [40], par injection au lapin de phosphate de phtaléine, puis extraction du glucuronide contenu dans les urines, par l'acétate d'éthyle. Ce dernier est précipité à l'état de sel de cinchonidine dans le méthanol et recristallisé trois fois dans le mélange acétate d'éthyle-méthanol.

La solution de phénolphtaléine-glucuronidate de sodium est préparée, suivant Talalay, Fishman et Huggins [109], en traitant 0,788 g de sel de cinchonidine par un excès d'HCl 2 N dans une ampoule à décantation. On extrait par l'acétate d'éthyle et évapore sous vide avec léger chauffage. Le résidu est neutralisé par addition de NaOH 0,1 N et le volume amené à 100 ml. La solution obtenue est 0,01 M en PPG.

2° *Pour l'arylsulfatase*

Nous avons utilisé le phénolphtaléine-disulfate, l'œstrone-sulfate, le nitrocatéchol-sulfate. Seul le nitrocatéchol-sulfate convient parfaitement.

a) Phénolphtaléine-disulfate (PPS)

Il est préparé suivant la technique indiquée par Whitehead, Morrisson et Young [119] qui comporte d'abord l'obtention du sulfate de phtaléine et de pyridine, puis celle du phénolphtaléine-sulfate de potassium par action de la potasse et précipitation dans l'éthanol absolu. Le produit est purifié par relargage à la potasse de la solution saturée et lavage à l'éthanol. On fait trois recristallisations par l'éthanol à partir de la solution aqueuse saturée.

b) Œstrone-sulfate de sodium (ŒS)

Nous utilisons le produit préparé par Schering A.G. (Berlin), conditionné en ampoules de 2 ml contenant 10 mg d'œstrone-sulfate en solution dans du tampon triéthanolamine-acide acétique.

c) Nitrocatéchol-sulfate de potassium (NCS)

Il est préparé suivant la technique de Smith [95], utilisée par Roy [85], à partir de p-nitrophénol, par action à + 37° du persulfate de potassium en présence de potasse aqueuse. Après extraction du phénol n'ayant pas réagi par l'éther en milieu acide, on concentre sous vide après alcalinisation et on précipite par l'acétone les sels minéraux. La solution acétonique est évaporée à sec sous vide, le produit obtenu recristallisé dans l'eau.

On le purifie suivant Dodgson et Spencer [27] en le redissolvant dans le minimum d'eau et en acidifiant à pH 4.2 avec de l'acide acétique. Le sel monopotassique précipite. On le recristallise deux fois en le dissolvant dans le minimum d'eau, puis on le transforme en sel dipotassique en ajoutant à la suspension aqueuse des cristaux de la potasse concentrée jusqu'à ce que le pH soit égal à 11. Le nitrocatécholdisulfate de K est précipité par addition à la solution d'un grand excès d'éthanol. Recueilli sur verre fritté, lavé à l'éthanol absolu, il est séché sous vide. Il cristallise avec 2 molécules d'eau.

3° *Pour la stéroïde-sulfatase*

Sulfate de déhydroépiandrostérone (DHAS)

Nous le préparons par la technique de Sobel et Spoerrs [97] par action du complexe SO_3-pyridine sur le stéroïde en solution dans le benzène sec.

Le sulfate de déhydroépiandrostérone et de pyridine est précipité par l'éther de pétrole et extrait par le chloroforme bouillant qui élimine l'excès de complexe SO_3-pyridine. Le sel de pyridinium est, suivant les indications de Roy [85], dissous dans le minimum d'éthanol à 70 % chaud et additionné d'un égal volume de solution saturée à froid de sulfate dipotassique. On réchauffe très doucement pour assurer la solution du sel de K en ajoutant à la pipette la quantité d'eau juste nécessaire. On refroidit rapidement, le sulfate de K et de déhydroépiandrostérone cristallise. On le purifie en le recristallisant de sa solution aqueuse saturée, son P.F. est + 223°C, conforme à celui indiqué par Burnstein et Lieberman [11 *bis*]. On a préparé également le sel de Na en substituant à la solution saturée à froid de sulfate de K une solution saturée de sulfate de Na. Le sulfate de Na et de déhydroépiandrostérone cristallise avec 2 H_2O, son P.F. = 172°-174°.

4° *Pour la cortisone-sulfatase*

Cortisone-21-sulfate (CORS)

Nous utilisons du sulfate de cortisone et de sodium Merck *.

C'est en faisant agir sur ces divers substrats les produits obtenus au cours du fractionnement du SHP que nous avons déterminé la teneur de ces fractions en β-glucuronidase, arylsulfatase, stéroïde-sulfatase, cortisone-sulfatase.

B. — MESURE DE L'ACTIVITÉ

Ces méthodes doivent être précises et permettre un travail en série, car les dosages à faire au cours d'un fractionnement sont nombreux. Puisqu'il s'agit de mesurer l'activité de la β-glucuronidase et de certaines sulfatases, on devrait doser l'acide glucuronique et les ions SO_4^{2-} libérés. On ne le fait pas toujours, car ces dosages sont longs ou peu précis. En pratique, on utilise comme substrat une substance dont la molécule unie à l'acide glucuronique ou à l'ion sulfate se prête à un dosage spectrophotométrique ou colorimétrique.

C'est pourquoi, après avoir indiqué le mode opératoire commun aux mesures des activités enzymatiques étudiées, nous décrirons les méthodes qui satisfont aux conditions indiquées plus haut et per-

(*) Nous remercions vivement le Docteur L.M. Sarett (Merck and Co. Inc., Ranway, New Jersey) de nous avoir procuré ce produit.

mettent pour chaque enzyme de préciser le pH optimum d'hydrolyse, la concentration saturante en substrat, les variations de la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps et de la concentration de l'enzyme.

Nous exposerons ensuite les méthodes employées pour le dosage des esters-sulfates et de l'ion SO_4^{2-}. Enfin, les activités enzymatiques étant rapportées à l'azote ou à la teneur en protéine, nous indiquerons comment nous pratiquons ces déterminations.

1° *Hydrolyse - Mode opératoire commun - Unité d'activité*

L'hydrolyse s'effectue au thermostat à + 37°5 en tube à essais. Le substrat, additionné de la solution tampon qui doit assurer le pH optimum, et l'enzyme sont mis séparément pendant cinq minutes au thermostat pour l'équilibre des températures. A des intervalles de trente secondes, on procède au mélange de l'enzyme et du substrat. Ces intervalles sont respectés au moment de l'arrêt de la réaction. Les hydrolyses sont exécutées en double. Un témoin dans lequel l'enzyme est ajouté juste avant l'arrêt de l'hydrolyse, est incubé en même temps.

La préparation enzymatique est employée à une dilution suffisante pour que l'hydrolyse du substrat ne dépasse pas 10 % en fin de réaction. Les proportions de chaque élément de la réaction étant maintenues, on peut doubler ou tripler les volumes de façon à avoir une quantité de produit d'hydrolyse à doser compatible avec les conditions optimum de dosage.

L'unité d'activité enzymatique (u) représente la quantité d'enzyme qui libère, par hydrolyse à + 37°5C, 1 μg de phénol ou de stérol. L'activité est arbitrairement rapportée à 1 ml de préparation et à une durée d'hydrolyse de une heure. Talalay, Fishmann et Huggins [109] exprimaient ainsi l'activité de la β-glucuronidase. Nous avons choisi l'expression en μg, plutôt que celle en μmole, qui est préférable, afin de comparer plus aisément nos résultats avec ceux publiés par les auteurs.

Le nombre d'unités par mg de protéine est l'activité spécifique. Nous l'exprimons par le nombre d'unités par μg d'azote, les protéines du SHP n'ayant pas la même teneur en azote.

Calcul des erreurs et comparaison des résultats

1) L'erreur pour chaque méthode de dosage spectrophotométrique a été calculée d'après Ringbom [84] :

$$\text{erreur } \% = 230{,}3 \;/\; dI \;/\; d \log c$$

formule dans laquelle dI est la différence des absorptions pour des concentrations dont d log c exprime la différence des logarithmes.

L'erreur photométrique est comptée comme étant égale à 1 %. La courbe en S obtenue en portant les absorptions en fonction des log des concentrations, permet de définir la zone des concentrations où la détermination sera la plus précise.

2) L'erreur dans les méthodes dans lesquelles le produit d'hydrolyse est extrait par un solvant avant d'être soumis à une réaction colorée appropriée, a été déterminée par le coefficient de variation calculé à partir des résultats obtenus sur plusieurs dosages à partir des quantités ajoutées au milieu de réaction [44, 61] :

n = nombre de déterminations
x = les résultats individuels
$\bar{x}$ = la moyenne des résultats

$$s^2 = \text{variance} = \frac{(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}$$

$$s = \text{écart-type} = \sqrt{s^2}$$

$$s_m = \text{écart-type de la moyenne} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$Cv = \text{coefficient de variation} = \frac{100\ s}{\bar{x}}$$

En appliquant le test « t » (t lu dans les tables pour (n — 1) degrés de liberté et pour la probabilité choisie)

$\bar{x} \pm ts_m$ = l'amplitude de la dispersion des mesures au seuil choisi

3) Comparaison des résultats : quand les résultats obtenus dans des conditions expérimentales différentes (pH, température, etc.) pour une même réaction d'hydrolyse sont peu éloignés les uns des autres, on applique le test « t » pour comparer les deux séries de résultats.

Soient n_a, x_a, $\bar{x}_a$, le nombre de données, les résultats individuels, la moyenne pour la série : a ; n_b, x_b, $\bar{x}_b$ pour la série : b ; s^2_a, s^2_b les variances pour chaque série.

On calcule l'écart-type de la différence s_d :

$$s_d = \sqrt{\frac{s^2_a}{n_a} + \frac{s^2_b}{n_b}}$$

Si la différence des moyennes $\bar{x}_a$ et $\bar{x}_b$ est plus grande que le produit $s_d t$, obtenu en prenant t pour la probabilité de 95 % pour $(n_a + n_b - 2)$ degrés de liberté, la différence est significative (cf. Lison [61] et Gautheret [44]).

2° *β-glucuronidase*

Le PPG est employé à la concentration finale $1,25\ 10^{-3}$ M. Le pH optimum 4.5 est realise par du tampon acéto-acétique de concentration finale 0.1 M.

a) Incubation

— PPG 0.005 M ..... 0,25 ml
— Tampon acéto-acétique 0,2 M ..... 0,50 ml
— Enzyme ..... 0,25 ml
— Thermostat : + 37°5C — Durée : 15 à 30 minutes

La réaction est arrêtée par addition de 4 ml d'un mélange, préparé au moment de l'emploi, de phosphate disodique 0.2 M et de phosphate trisodique 0,2 M en proportions convenables pour avoir un pH : 10,45, vérifié à l'électrode de verre. La densité optique de la coloration est évaluée à 550 mμ sous 1 cm d'épaisseur. De 10 à 30 μg l'erreur commise est de ± 3,2 %.

b) Vitesse d'hydrolyse en fonction du temps et de la concentration en enzyme

Il y a proportionnalité entre la quantité de phtaléine libérée et la durée d'hydrolyse pour des temps compris entre quinze et soixante minutes.

De même, il y a proportionnalité avec la concentration en enzyme dans un intervalle assez large de dilution (Jarrige et Henry [56]).

3° *Arylsulfatase*

Des substrats très divers ont été employés pour mesurer l'activité des arylsulfatases. Nous avons utilisé le phénolphtaléine-sulfate, l'œstrone-sulfate, le nitrocatéchol-sulfate. Nous verrons que ce dernier est celui qui convient le mieux pour cette détermination.

a) Phénolphtaléine-sulfate (PPS)

La concentration saturante en substrat est 0,5 mM (*fig. 1*), le pH optimum 5,5 en tampon acétoacétique, 6 en tampon tris-maléique.

1) *Incubation :*

— PPS 0,01 M ..... 0,50 ml
— Tampon acéto-acétique 0,5 M ..... 0,25 ml
— Enzyme ..... 0,25 ml
— Thermostat : 37°5C — Durée : 30 minutes

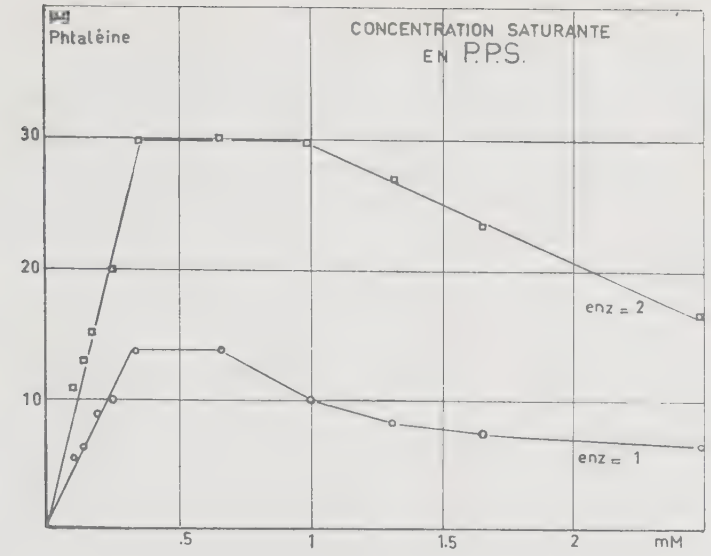


FIGURE 1 : Concentration saturante de phénolphtaléine-sulfate, pour l'arylsulfatase du SHP, en fonction de la concentration en enzyme

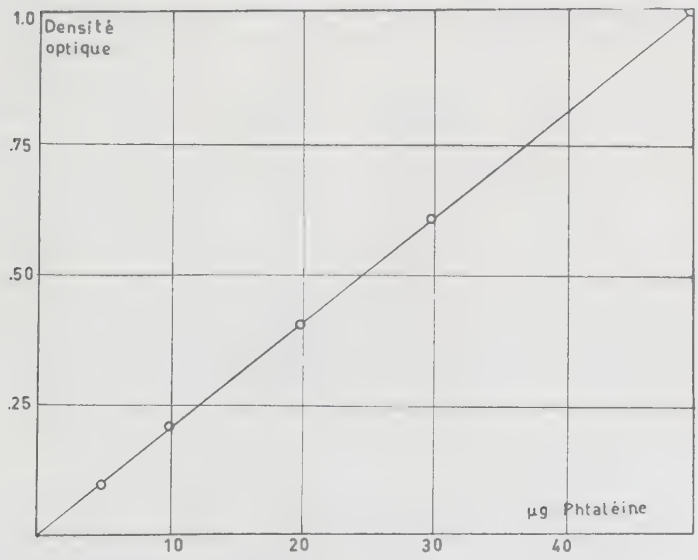


FIGURE 2 : Densité optique de la coloration de la phénolphtaléine à pH 10,45, en fonction de la concentration. Absorption mesurée à 550 mµ, sous 1 cm d'épaisseur

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 4 ml d'un mélange, préparé au moment de l'emploi, de phosphate disodique 0,2 M et de phosphate trisodique 0,2 M de façon à obtenir un pH de 10,45 vérifié à l'électrode de verre. Le pHmètre est étalonné à pH : 9,22 à + 20°C avec du tampon borate préparé suivant « Official methods of analysis of the A.O.A.C. » [76]. La densité optique de la coloration obtenue est évaluée à 550 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur.

La droite d'étalonnage du spectrophotomètre est tracée en faisant agir le réactif alcalin sur des prises d'essais correspondant à des quantités comprises entre 5 μg et 50 μg de phénolphtaléine. Pour cela, on dilue avec de l'eau distillée, juste au moment du besoin, une solution de phénolphtaléine à 0,1 g/100 ml d'éthanol à 90 % conservée en flacon bouché émeri. La coloration est stable trente minutes.

Les densités optiques portées en fonction des concentrations en phénolphtaléine (PP) s'inscrivent sur une droite (*fig. 2*).

2) *Vitesse d'hydrolyse en fonction du temps et de la concentration en enzyme :*

Il y a proportionnalité entre la quantité de PP libérée et la quantité d'enzyme seulement dans un intervalle étroit de concentrations et pour des hydrolyses peu prolongées (*fig. 3*). Ceci s'explique par la variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat. Ce dernier a un effet inhibiteur quand sa concentration par rapport à celle de l'enzyme dépasse la concentration saturante (*fig. 1*). Huggins et Talalay [55] avaient constaté les mêmes faits avec le phénolphtaléine-phosphate employé comme substrat des phosphatases. Les quantités de PP libérée en fonction du temps par des concentrations croissantes d'enzyme s'inscrivent sur des portions de paraboles. Il y a une relation linéaire seulement entre les logarithmes des quantités de PP et les logarithmes des concentrations enzymatiques. Pour cette raison, nous n'utilisons plus ce test que pour mesurer l'activité relative des différents échantillons d'SHP que l'on dilue toujours dans le même rapport.

b) Œstrone-sulfate (ŒS)

La concentration saturante en substrat est 0,5 mM (*fig. 4*). Le pH optimum en tampon tris-maléique ou en tampon citrate est égal à 5 (*fig. 5*).

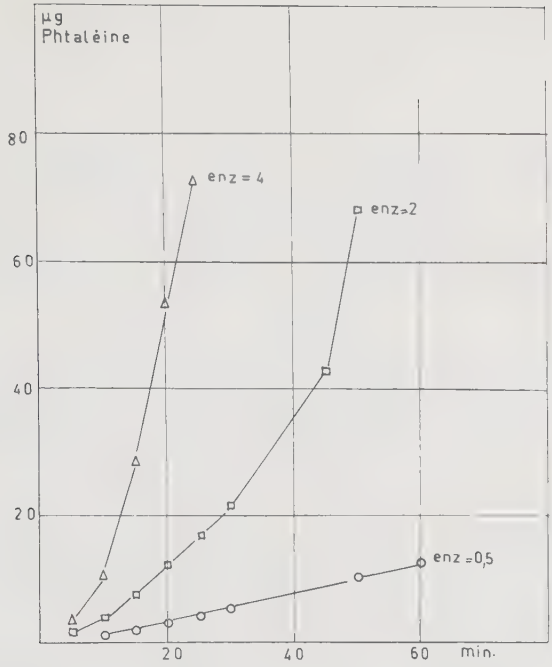


FIGURE 3 : Hydrolyse du phénolphtaléine-sulfate en fonction du temps et de la concentration de l'enzyme

FIG. 4 : Concentration saturante d'œstrone-sulfate, pour l'arysulfatase du SHP

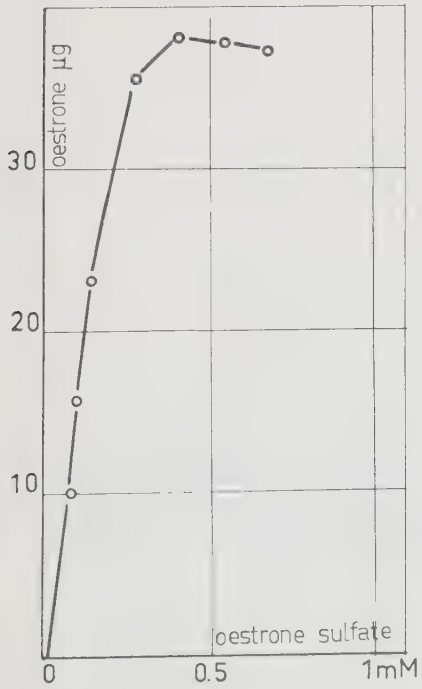
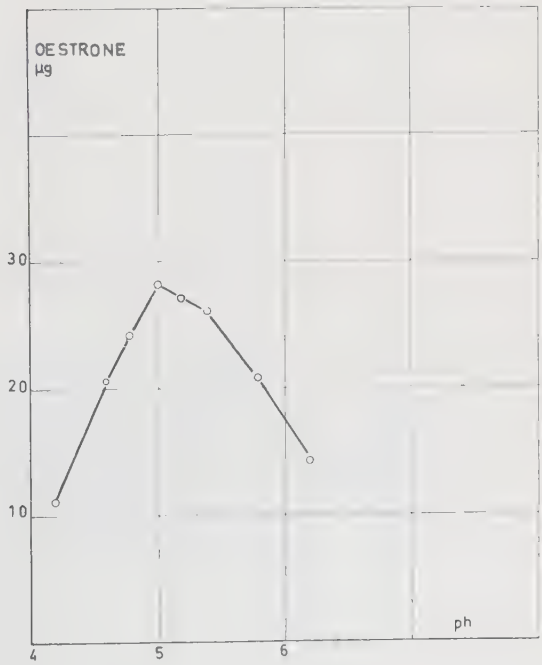


FIG. 5 : pH optimum d'hydrolyse de l'œstrone-sulfate, par l'arysulfatase du SHP



1) *Incubation :*

On prépare au préalable une solution, ajustée à pH 5, contenant le substrat et le tampon tris-maléique :

— Œstrone-sulfate	20 mg
— Tampon tris-maléique 0,2 M	50 ml
— Eau distillée pour compléter à	75 ml

La solution est 0,72 mM en œstrone-sulfate.

L'hydrolyse est effectuée en mélangeant :

— Solution d'œstrone-sulfate	0,75 ml
— Enzyme	0,25 ml

La concentration finale du milieu est 0,54 mM en œstrone-sulfate, 0,1 M en tampon.

On laisse au thermostat à + 37°5C pendant trente minutes.

La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de NaOH 1,5 N. On refroidit dans l'eau glacée.

L'œstrone libérée est extraite par le chlorure de méthylène après avoir ajusté le milieu à pH 5 par addition de 2,5 ml d'acide acétique 1 M.

On procède à 3 extractions successives avec 10 ml, 5 ml et 5 ml de solvant, en ampoule à décantation cylindrique, bouchée à l'émeri, agitée sur un tapis roulant pendant dix minutes lors de chaque extraction. Le solvant est décanté sur un entonnoir dont la douille est garnie d'un petit tampon de coton de verre hyperfin et d'un peu de sulfate de sodium anhydre, et recueilli dans un tube à essai, puis évaporé sous un courant d'air comprimé convenablement réglé et filtré.

On effectue la réaction de Kober, modifiée par Brown [11], en observant les trois étapes suivantes :

a)	Addition au résidu d'évaporation du solvant de : solution d'hydroquinone à 4 % dans l'éthanol absolu	0,1 ml
	évaporation sous vide dans un exsiccateur pendant 12 heures	
b)	Action au bain-marie à + 100°C pendant 20 minutes de ac. sulfurique à 66 % (vol/vol).	3 ml
	refroidissement dans la glace fondante	
c)	Nouveau chauffage au bain-marie bouillant pendant 10 minutes après addition d'eau distillée	0,5 ml
	refroidissement dans la glace fondante	

La densité optique de la coloration obtenue est mesurée à 510 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, au photomètre Unicam S.P. 600. La réaction est effectuée, lors de chaque série de dosages, en même temps sur des prises d'essais d'une solution alcoolique d'œstrone

(2 à 15 µg), préalablement évaporée comme les extraits de réactions d'hydrolyse. Les densités optiques correspondant aux différentes quantités d'œstrone s'inscrivent sur une droite.

2) *Vitesse d'hydrolyse en fonction du temps et de la concentration en enzyme :*

Il y a proportionnalité entre la quantité d'œstrone libérée et la durée d'hydrolyse jusqu'à trente minutes. Comme dans le cas du PPS, la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en enzyme dans un intervalle étroit de concentrations enzymatiques (*fig. 6*).

c) Nitrocatéchol-sulfate (NCS)

L'hydrolyse du NCS ou 2-hydroxy 5-nitrophénylsulfate dipotassique par l'arylsulfatase, en tampon acéto-acétique, augmente avec le pH jusqu'aux limites du pouvoir tampon de ce mélange. L'effet de concentrations croissantes en NCS à pH 6 se manifeste par une vitesse maximum pour une concentration 2 mM en NCS et par une baisse de la vitesse d'hydrolyse au delà de cette concentration. C'est pour cette raison que nous utilisons le tampon tris-maléique de Gomori [48] dont le pouvoir tampon s'exerce de pH 6,3 à pH 8,1. Le pH optimum de l'arylsulfatase d'SHP est compris entre 7,2 et 7,6. Les valeurs trouvées à ces différents pH sont très voisines (*fig. 7*).

La concentration saturante en substrat en présence du tampon tris-maléique est 15 mM (*fig. 8*).

1) *Incubation :*

Le substrat est préalablement dissous en présence de tampon tris-maléique et le pH de la solution ajusté à 7,2 :

— NCS ..... 0,5725 g
— Tampon 0,4 M ..... 25 ml
— Eau distillée pour compléter à ..... 75 ml

La solution est 0,022 M en NCS, 0,133 M en tampon.

La réaction d'hydrolyse comporte le mélange de :

— Solution de NCS ..... 0,75 ml
— Enzyme ..... 0,25 ml

La concentration du milieu d'hydrolyse est 0,0165 M en NCS, 0,1 M en tampon. On laisse au thermostat à + 37°5C pendant quinze minutes. La réaction est stoppée par 3 ml de réactif au quinol alcalin de Roy [85]. Ce réactif est préparé au moment de l'emploi en mélangeant :

— Soude 2,5 N, contenant 50 g/100 ml de $Na_2SO_3 . 7 H_2O$ ..... 100 ml
— Hydroquinone 4 g/100 ml d'HCl 0,1 N .... 5 ml

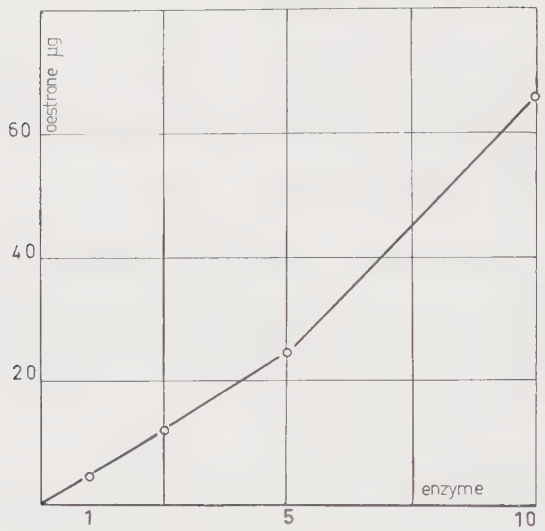


FIGURE 6 : Hydrolyse de l'œstrone-sulfate en fonction de la concentration de l'enzyme

FIG. 7 : pH optimum d'hydrolyse du nitrocatéchol-sulfate par l'arylsulfatase du SHP

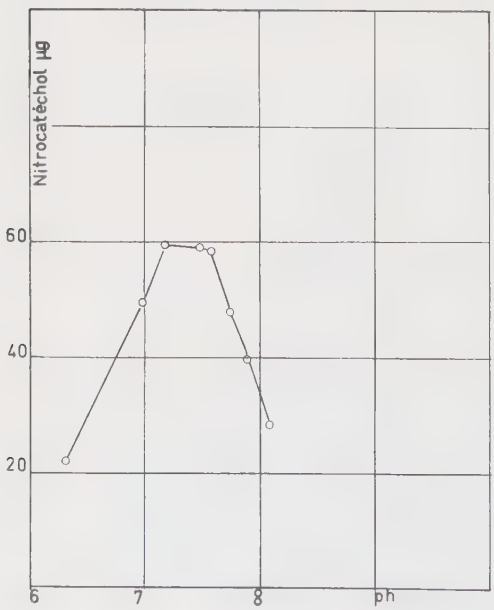
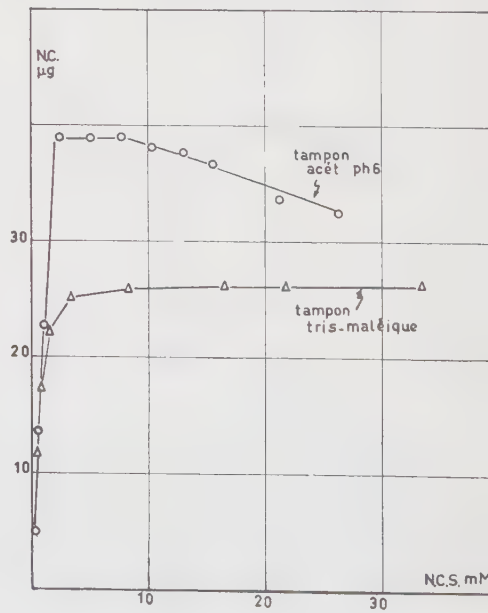
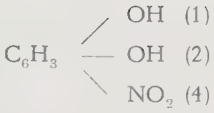


FIG. 8 : Concentration saturante de nitrocatéchol-sulfate pour l'arysulfatase du SHP, en fonction de la nature du tampon



Le nitrocatéchol (NC) :



donne avec ce réactif une coloration rouge, stable pendant trente minutes.

L'étalonnage est effectué avec du nitrocatéchol obtenu par hydrolyse du NCS (56 mg de NCS dissous dans 50 ml. HCl 1 N sont chauffés au bain-marie bouillant pendant quinze minutes. On refroidit et complète à 250 ml. 1 ml de cette solution contient 100 μg de nitrocatéchol).

La solution de NCS étant colorée en jaune, à des prises d'essais s'échelonnant de 10 à 50 μg de NC, on ajoute de la solution de NCS en tampon tris-maléique de façon à réaliser dans 1 ml les concentrations qui sont celles de la réaction enzymatique, puis on ajoute 3 ml de réactif de Roy (*fig. 9*). On lit au photomètre à 520 mμ sous 1 cm.

Nous avons contrôlé notre étalonnage avec du NC que Roy nous a aimablement adressé.

Pour les concentrations de 4 à 30 μg de NC, l'erreur est de $\pm$ 3,4 %. Elle est égale à $\pm$ 2,9 % pour des concentrations de 10 à 30 μg.

2) *Vitesse hydrolyse en fonction du temps et de la concentration en enzyme :*

La quantité de NC libéré est proportionnelle à la durée d'hydrolyse jusqu'à quinze minutes.

La vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en enzyme dans un large intervalle de concentrations, le temps d'hydrolyse est toujours limité à la durée nécessaire pour avoir une libération de 10 à 30 μg de NC (*fig. 10*).

4° *Stéroïde-sulfatase*

L'activité de la stéroïde-sulfatase est déterminée par l'hydrolyse du déhydroépiandrostérone sulfate.

Déhydroépiandrostérone sulfate (DHAS)

Le pH optimum d'hydrolyse en tampon acéto-acétique est 4,5 (*fig. 11*). La concentration saturante en DHAS est 0,6 mM, et il n'y a pas de diminution de la vitesse d'hydrolyse pour des concentrations supérieures en substrat (*fig. 12*).

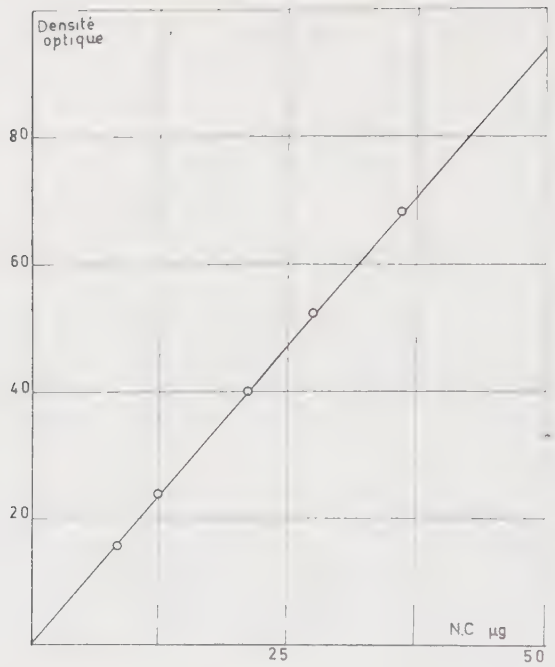


FIGURE 9 : Densité optique de la coloration du nitrocatéchol en présence de réactif au quinol alcalin. Absorption mesurée à 520 mμ sous un cm d'épaisseur

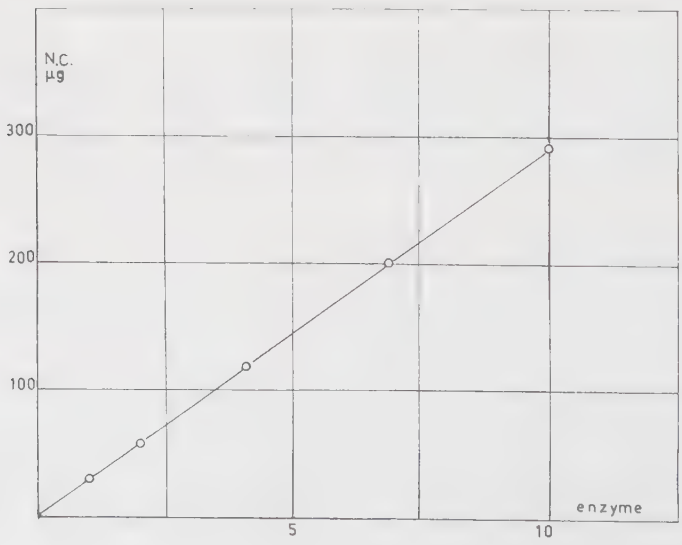


FIGURE 10 : Hydrolyse du NCS.
Quantité de NC libérée en fonction de la concentration en enzyme

1) *Incubation :*

La solution aqueuse de DHAS étant de mauvaise conservation, même en glacière, nous préparons une solution de DHAS 8 mM dans de l'eau distillée contenant 24/100 en volume de triéthanolamine. Cette solution mère est diluée au moment de l'emploi de la façon suivante :

— Solution mère ..... 3 ml
— Acide acétique 1 M pour pH 4,5 ..... 10 ml
— Tampon acéto-acétique 1 M (pH 4,5) pour compléter à 25 ml

Cette solution est 0,96 mM en DHAS.

L'hydrolyse est effectuée en mélangeant :

— DHAS 0,96 mM ..... 0,5 ml
— Enzyme ..... 0,3 ml

On laisse trente minutes au thermostat à 37°5C.

La réaction est arrêtée par immersion au bain-marie bouillant pendant trois minutes. On refroidit aussitôt dans l'eau glacée et on ajoute :

— Eau distillée ..... 5 ml

La déhydroépiandrostérone (DHA) libérée est extraite par le chlorure de méthylène et dosée par la réaction de Zimmermann après évaporation du solvant. Le solvant est distillé avant d'être employé.

On procède à 3 extractions par le chlorure de méthylène (10, 5, 5 ml) en ampoule à décantation cylindrique bouchée émeri. L'ampoule est mise sur un tapis roulant pendant dix minutes pour chaque extraction. Le solvant est séparé chaque fois et reçu dans un tube à essais surmonté d'un entonnoir dont la douille est garnie d'un petit tampon de coton de verre hyperfin et d'un demi-gramme de sulfate de soude anhydre. A la fin de l'opération, on rince l'entonnoir avec 3 ml de chlorure de méthylène. Le solvant est évaporé par un jet d'air comprimé convenablement réglé et filtré. Au résidu, contenu dans chaque tube, on ajoute :

— Ethanol à 96/100 ..... 0,2 ml
— KOH 20/100 dans l'éthanol absolu ..... 0,2 ml
— m-dinitrobenzène 1/100 dans l'éthanol absolu 0,2 ml

La potasse alcoolique et la solution alcoolique de m-dinitrobenzène sont préparées immédiatement avant l'emploi. Les tubes sont mis au thermostat à + 35°C, à l'obscurité, pendant quarante minutes. Ils sont ensuite plongés dans l'eau glacée, à l'abri de la lumière. Le produit coloré formé est extrait par l'éther en ajoutant dans l'ordre :

— Ethanol à 30/100 ..... 2 ml
— Ether (exempt de peroxydes) ..... 5 ml

Les tubes à essais employés sont bouchés émeri. On agite à la main chaque tube, on laisse l'éther se séparer et on mesure la densité optique de la couche éthérée à 510 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur.

Lors de chaque série de dosages, on fait la réaction de Zimmerman sur le résidu d'évaporation de prises d'essais d'une solution éthanolique de DHA correspondant à 10, 20, 30, 50 μg de stéroïde. Il y a peu de variations d'un étalonnage au suivant, néanmoins il est préférable de ne pas se référer à une droite d'étalonnage établie une fois pour toutes.

2) *Vitesse d'hydrolyse en fonction du temps et de la concentration en enzyme :*

La vitesse est régulière pendant trente minutes (*fig. 13*).

Elle est proportionnelle à la concentration en enzyme dans les conditions où l'hydrolyse ne dépasse pas 10 % du substrat. La précision de la méthode est de ± 8 %.

5° *Cortisone-sulfatase*

L'activité de la cortisone-sulfatase est déterminée par l'hydrolyse du cortisone-21-sulfate.

Cortisone-21-sulfate (CORS)

Le pH optimum d'hydrolyse est : 4,5 en tampon acétate (*fig. 14*); la concentration saturante en substrat : 0,5 mM (*fig. 15*).

1) *Incubation :*

Une solution 1 mM de CORS Merck est utilisée. La réaction est effectuée en tubes à centrifuger coniques de 15 ml de capacité. Après équilibre des températures, sont mis en présence :

— CORS 1 mM	0,5 ml
— Tampon acéto-acétique 0,5 N (pH 4,5)	0,25 ml
— Enzyme	0,25 ml

On laisse au thermostat à + 37°5C pendant trente minutes. La réaction est arrêtée par un chauffage de trois minutes au bain-marie bouillant. Les tubes sont refroidis aussitôt.

L'extraction de la cortisone libérée est effectuée par du chloroforme dont 6 ml sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes bouchés disposés horizontalement dans un coffret, dont le couvercle maintient les bouchons, sont placés sur un agitateur mécanique à vitesse de va-et-vient réglable, pendant cinq minutes. L'émulsion est rompue

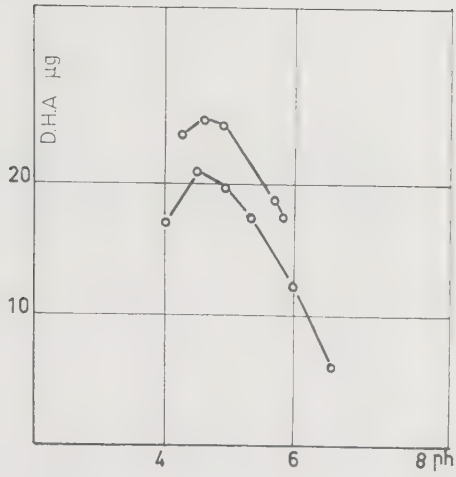


FIG. 11 : pH optimum d'hydrolyse du sulfate de déhydroépiandrostérone par la stéroïde-sulfatase du SHP

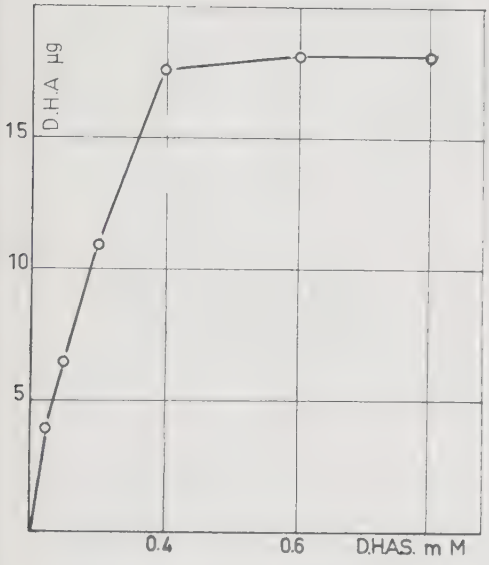
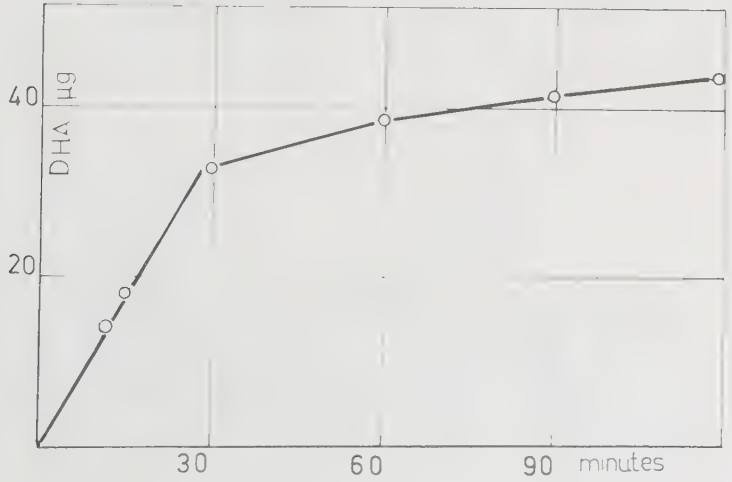


FIG. 12 (*ci-contre*) : Concentration saturante du sulfate de déhydroépiandrostérone pour la stéroïde-sulfatase du SHP

FIG. 13 (*ci-dessous*) : Hydrolyse enzymatique du sulfate de déhydroépiandrostérone en fonction du temps



par une centrifugation de dix minutes à 4.000 tours minute. On prélève 5 ml de la couche chloroformique dans des tubes à essai secs. Le chloroforme est évaporé à la température du laboratoire sous un courant d'air filtré.

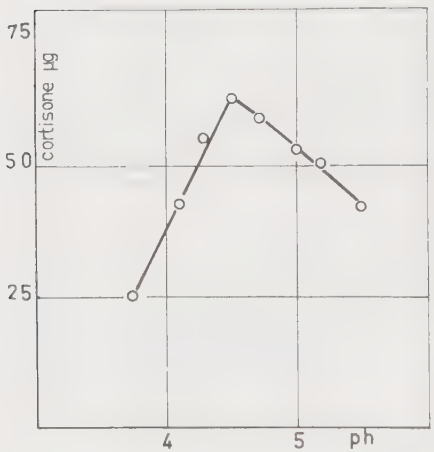


Fig. 14 : pH optimum d'hydrolyse du cortisone 21-sulfate par la cortisone-sulfatase du SHP

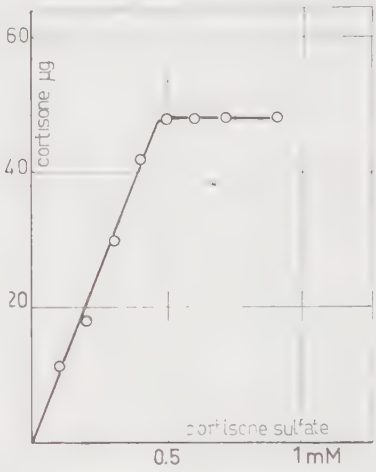


Fig. 15 : Concentration saturante du cortisone 21-sulfate pour la cortisone-sulfatase du SHP

Figure 16 : Densité optique de la cortisone en solution dans l'éthanol absolu. Absorption mesurée à 236 mµ sous 1 cm d'épaisseur

Des essais sur des quantités de cortisone ajoutée ont montré que la quantité de chloroforme est suffisante, qu'il est inutile de diluer le liquide de réaction d'hydrolyse avant l'extraction et que le rendement de l'extraction est compris entre 94 et 98 %.

Le résidu d'évaporation de l'extrait chloroformique est dissous dans 3 ml d'éthanol absolu et la quantité de cortisone présente déduite de l'absorption à 236 mμ en cuve de quartz de 1 cm d'épaisseur (*fig. 16*) au spectrophotomètre Jobin et Yvon. L'appareil est réglé au zéro avec l'éthanol utilisé pour la solubilisation de la cortisone. Pour chaque série de dosages, quatre prises d'essais (2, 5, 10, 20 μg) de cortisone en solution alcoolique sont soumises aux différents temps de l'extraction, après évaporation de l'alcool. Le témoin de réaction d'hydrolyse, contenant l'enzyme ajouté au cours du séjour au bain-marie bouillant, permet d'apporter la correction due à l'enzyme. La forte activité du SHP ou des fractions obtenues vis à vis du CORS permettent des mesures avec des quantités extrêmement faibles de protéine enzymatique et le témoin donne une valeur pratiquement négligeable.

2) *Vitesse d'hydrolyse en fonction du temps et de la concentration en enzyme :*

La vitesse est constante pendant trente minutes et proportionnelle à la concentration en enzyme dans les limites où l'hydrolyse ne dépasse pas 10 % du substrat. La précision de la méthode est de ± 6 %.

6° *Dosage des esters-sulfates*

Les arylsulfates et les stéroïde-sulfates en milieu acide se combinent au bleu de méthylène en donnant des complexes colorés solubles dans le chloroforme. C'est la méthode de Vlitos [112] qui dosait ainsi le dichlorophénoxyéthylsulfate non hydrolysé par *Bacillus cereus* var. *mycoïdes*. Elle a été adaptée par Roy [89] au dosage des stéroïde-sulfates.

Le réactif au bleu de méthylène a la composition suivante :

— Chlorure de bleu de méthylène	250 mg
— Sulfate de soude anhydre	50 mg
— Acide sulfurique concentré	10 ml
— Eau distillée pour avoir	1.000 ml

a) Mode opératoire

La réaction d'hydrolyse enzymatique est réalisée dans les conditions de pH optimum et de concentration saturante en substrat de

façon à avoir dans le mélange une quantité d'ester-sulfate ⩽ 150 μg. Elle est effectuée en tubes à centrifuger de 15 ml.

Dans le cas du DHAS, on prend :

— DHAS 0,96 mM pH 4,5	0,25 ml
— Enzyme	0,15 ml

Dans le cas du CORS, on prend :

— CORS 1 mM	0,25 ml
— Tampon acéto-acétique 0,625 M, pH 4,5 ..	0,20 ml
— Enzyme	0,05 ml

Le séjour au thermostat à + 37°5C est de quinze minutes, l'enzyme étant dilué pour avoir dans ces conditions environ 10 % d'hydrolyse.

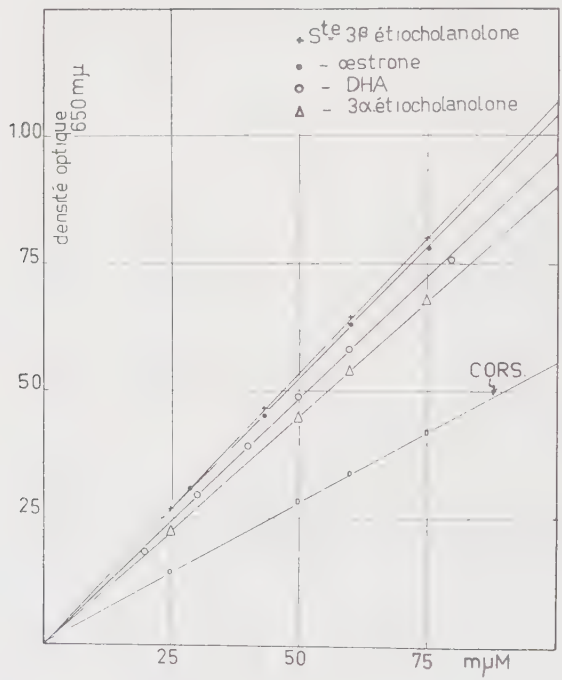


FIGURE 17 : Dosage des complexes « stéroïdes-sulfates-bleu de méthylène ». Courbes d'étalonnage établies par mesure de l'absorption à 650 mμ des solutions chloroformiques des complexes sous 2 mm d'épaisseur

Le temps écoulé, chaque tube est plongé dans l'eau glacée et la réaction enzymatique stoppée par addition d'éthanol absolu (5,6 ml dans le cas de l'hydrolyse du DHAS, 5,5 dans le cas du CORS). Après

centrifugation du précipité de protéine, on prélève, dans un tube identique, 5 ml du liquide surnageant le précipité. On évapore le solvant au bain-marie bouillant. Après refroidissement, 1 ml de réactif au bleu de méthylène est ajouté, puis 6 ml de chloroforme. On bouche hermétiquement et on soumet à une agitation mécanique contrôlée les tubes placés dans un coffret où ils sont maintenus en position horizontale. L'agitation (3 ou 4 va-et-vient par seconde) dure quatre-vingt-dix secondes. On centrifuge dix minutes pour rompre l'émulsion et on mesure la densité optique de la couche chloroformique sous 2 mm d'épaisseur à 650 mμ.

Quatre témoins sont soumis aux mêmes opérations. Deux ne contiennent pas de substrat, mais en lieu et place le tampon employé dans la réaction d'hydrolyse, les deux autres le substrat et l'enzyme ajouté immédiatement avant l'addition d'éthanol.

Lors de chaque série de dosages, la droite d'étalonnage est tracée en prenant des quantités de stéroïde-sulfate en solution éthanolique correspondant à 10, 20, 50, 100 mμ M.

On déduit la quantité de stéroïde-sulfate hydrolysé de la quantité de stéroïde-sulfate restant après hydrolyse. On transforme en DHA en multipliant le nombre de μg de DHAS trouvé par 0,68.

b) Observations

Le coefficient de partage du complexe (stéroïde-sulfate + bleu de méthylène) dans le chloroforme n'est pas le même pour les différents stéroïdes-sulfates (*fig. 17*).

L'emploi de l'éthanol pour stopper la réaction enzymatique et extraire le stéroïde-sulfate non hydrolysé est indispensable, même lorsque la quantité de protéine enzymatique mise en œuvre paraît négligeable, comme le montrent les essais suivants :

1) *Hydrolyse du DHAS par SHP brut :*

Enzyme : 0,05 ml (1.250 μg d'azote)

Dosage sans addition d'éthanol	*Dosage après addition d'éthanol*
— Nombre de déterminations : $n = 9$	$n = 9$
— Moyenne des résultats : $\bar{x} = 6{,}3$ mμM DHA	$\bar{x} = 11{,}65$ mμM DHA
— Ecart-type de la moyenne : $s_m = 0{,}62$	$s_m = 0{,}47$
— Amplitude de la dispersion des mesures au seuil de 95 % : $\bar{x} \pm ts_m = 6{,}3 \pm 1{,}4$	$\bar{x} \pm ts_m = 14 \pm 1{,}06$

2) Hydrolyse du DHAS par une préparation purifiée :

Enzyme : 0.02 ml (45 μg d'azote)

Dosage sans addition d'éthanol	*Dosage après addition d'éthanol*
— Nombre de déterminations : n = 11	n = 9
— Moyenne des résultats : $\bar{x}$ = 12,8 mμM DHAS	$\bar{x}$ = 16.9 mμM DHAS
— Ecart-type de la moyenne : s_m = 0,62	s_m = 0.365
— Amplitude de la dispersion des mesures au seuil de 95 % : $\bar{x} \pm ts_m$ = 12,8 ± 1,38	$\bar{x} \pm ts_m$ = [illegible]

Dans les conditions indiquées, pour des hydrolyses limitées à 10 ou 20 % du substrat, le coefficient de variation s'établit ainsi :

— Nombre de déterminations :	n = 30
— Moyenne des résultats :	$\bar{x}$ = 29.9 mμM DHAS
— Ecart-type :	s = 1.22
— Ecart-type de la moyenne :	s_m = 0.22
— Amplitude de la dispersion des mesures au seuil de 95 % :	$\bar{x} \pm ts_m$ = 29.9 ± 0.45
— Coefficient de variation :	$C = \frac{100\ s}{\bar{x}}$ = 4.08 %

Dans le milieu d'hydrolyse enzymatique étaient présentes 35,5 mμM ; 5.6 mμM ont été hydrolysées. L'erreur sur cette différence est de l'ordre de 20 %. On conçoit que la méthode est peu précise quand elle est utilisée pour apprécier la quantité de DHA libérée. Elle est cependant très utile pour les dosages en série. Elle permet de limiter les dosages par extraction et réaction de Zimmermann.

7° *Dosage des ions* SO_4^{2-}

C'est un dosage difficile à réaliser avec précision à l'échelle microanalytique. Il y a les méthodes à la benzidine et la méthode néphélométrique.

Les premières sont très délicates à mener à bien, attendu que la valeur du résultat dépend de la qualité de la séparation et du lavage du précipité de sulfate de benzidine dans lequel on dose l'amine. Une microméthode a été proposée par Dodgson et Spencer [26], une ultramicrométhode par Spencer [103].

Nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants en appliquant ces méthodes à la mesure de l'activité de la stéroïde-sulfatase.

Une modification de la méthode de KENT et WHITEHOUSE [58], publiée récemment par HAKKINEN [51], paraît résoudre le problème et assure une détermination de 10 à 20 μg d'ions SO_4^{2-} avec une erreur inférieure à 5 %.

La méthode néphélométrique a été l'objet de nombreux travaux. DODGSON [17] l'a utilisée pour mesurer l'activité de la glucose-sulfatase et de la cortisone-sulfatase. L'obtention de résultats reproductibles dépend des conditions de précipitation du sulfate de baryum. Nous avons utilisé la technique de CRÉPY [14], mais n'avons pas obtenu de résultats valables pour l'étude de la stéroïde-sulfatase. En effet, l'hydrolyse de la plupart des stéroïde-sulfates (cortisone-21-sulfate excepté) s'accompagne de l'apparition d'un trouble dû à l'insolubilité du stéroïde libéré dans le milieu de réaction enzymatique. Un témoin sans chlorure de baryum permet d'évaluer le trouble dû au stéroïde libéré, mais le résultat calculé par différence est très imprécis.

C. — DOSAGE DES PROTÉINES

Les activités spécifiques enzymatiques sont exprimées habituellement par le nombre d'unités rapporté à un mg de protéine. Comme les activités des enzymes étudiés ici sont déterminées sur des mélanges hétérogènes de protéines et que les réactions des protéines actives sur les substrats ne sont pas stoechiométriquement définies, nous les avons rapportées à l'azote protéique.

On peut doser l'azote après minéralisation ou les protéines par colorimétrie, ou mesure de l'absorption à 278 mμ. Nous exposerons d'abord le dosage de l'azote par microkjeldahl et ensuite dans quels cas et dans quelles conditions nous utilisons les autres méthodes.

1° *Microkjeldahl*

Cette méthode comporte trois étapes :

a) minéralisation de la matière organique ;

b) distillation de l'ammoniaque ;

c) dosage de l'ammoniaque.

a) Minéralisation

Elle est effectuée dans de petits matras en pyrex dont la partie renflée a une capacité de 15 ml et le col 155 mm de longueur et 15 mm de diamètre. Les prises d'essais (0,5 à 1 ml) contiennent 20 à 150 μg d'azote. On chauffe en présence de 0,5 ml d'acide sulfurique concentré et de 10 mg de catalyseur de Dumazert et Marcelet [32] au sélénite de mercure. Le chauffage est maintenu une heure après décoloration. Deux témoins réactifs et deux témoins contenant 100 μg d'azote sont soumis aux mêmes conditions.

La solution étalon d'azote à 1.000 μg par ml est préparée en dissolvant 1.179 g de sulfate d'ammonium, séché plusieurs jours dans un exsiccateur, dans une quantité suffisante d'acide sulfurique 0,2 N pour avoir 250 ml.

b) Distillation de l'ammoniaque

L'ammoniaque est déplacée par la soude et recueillie dans une solution d'acide borique.

Réactifs :

— Soude à 40 % (poids/vol.) : La soude en pastilles est dissoute dans de l'eau distillée et portée à l'ébullition pendant 15 minutes en présence de grenaille de zinc. Le volume est complété avec de l'eau distillée, après refroidissement et décantation.

— Acide borique : La solution est préparée suivant Irving Sher [94] en ajoutant à 17,5 ml d'indicateur, une solution d'acide borique à 20 g/1.000 en quantité suffisante pour avoir deux litres de solution.

— Indicateur : Il résulte du mélange des deux solutions suivantes :

1)	— Vert de bromocrésol	350 mg
	— Ethanol 95 %	10 ml
	— Soude 0,5 N	1 ml
	— Eau distillée	200 ml
2)	— Coccine nouvelle 1 %	22,1 ml
	— p. nitrophénol	750 mg
	minimum d'éthanol	
	— Eau distillée pour avoir	250 ml

La distillation est faite dans l'appareil de Markham [63] en suivant les indications de l'auteur : chauffage du générateur de vapeur d'eau 30 minutes avant le début de l'emploi de l'appareil, durée de distillation de deux minutes comptées à partir du moment où la condensation est apparente en haut du réfrigérant. Le contenu du matras de minéralisation est versé dans l'entonnoir de l'appareil et rincé en trois fois avec 8 ml d'eau distillée additionnée d'une goutte de phénol-

phtaléine à 1/100. La soude (2,5 ml) est introduite alors que l'extrémité du réfrigérant plonge dans 5 ml d'acide borique, contenu dans un bécher de 30 ml portant un trait de repère indiquant le volume final à obtenir en fin de distillation.

c) Dosage de l'ammoniaque

A l'aide d'une microseringue Agla, de l'acide chlorhydrique 0,1 N est ajouté au distillat. Le mélange est assuré par un barreau magnétique. L'acide chlorhydrique est titré au borate de soude étalon préparé suivant « Official methods of analysis of the Association of Agricultural Chemist » [76] en employant l'incateur d'Irving Sher au lieu du rouge de méthyle.

Pour apprécier le virage, avant chaque série de dosages, 20 ml de tampon phtalate ou acétate de pH 4,5, 4,6 et 4,7 sont versés dans trois béchers identiques à ceux utilisés pour recueillir le distillat, la quantité d'indicateur équivalente à celle qui est contenue dans 5 ml de la solution d'acide borique est ajoutée aux 20 ml de chaque tampon. Le témoin à pH 4,5 est jaune, celui à pH 4,6 gris (teinte à obtenir), celui à pH 4,7 bleu gris. Il suffit de 0,0015 ml d'HCl 0,1 N pour passer du bleu au gris et du gris au jaune.

Un centième de ml d'HCl 0,1 N correspondant à 14 μg d'azote, on en déduit, après correction pour les traces d'ammoniaque décelées dans les témoins réactifs, la teneur en azote des échantillons.

2° *Dosage colorimétrique*

Il est effectué par la méthode de Lowry [62]. Elle n'est applicable qu'à la condition de disposer, pour l'étalonnage, de la protéine à doser. C'est pourquoi nous ne l'employons que pour les dosages de protéines après chromatographie ou électrophorèse, après étalonnage avec la préparation protéique dialysée et lyophilisée.

3° *Dosage par mesure de l'absorption dans l'U.V.*

Le dosage des protéines par mesure de l'absorption à 278 mμ est utilisé concurremment au dosage colorimétrique quand le tampon employé au cours de la chromatographie ou de l'électrophorèse n'absorbe pas ou absorbe peu à cette longueur d'onde.

Chapitre 2

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU SHP

Après avoir indiqué comment est prélevé le SHP, nous étudierons son comportement vis-à-vis des différents agents physiques et chimiques puis le fractionnement des protéines qu'il contient.

A. — MATIÈRE PREMIÈRE

1° *Prélèvement*

Le SHP est obtenu par dissection d'escargots de Bourgogne operculés et conservés en sommeil en chambre froide à + 5° ou non operculés et gardés quelques jours à jeun. On casse la coquille avec précaution et dans la masse viscérale le tube digestif apparaît coloré en rouge brun. L'extrémité émergeant de l'hépatopancréas est rompue à l'aide d'une pince que l'on maintient fermée sur le tube afin d'éviter que le suc ne se répande. On dépose sur un entonnoir placé sur un flacon le tube encore uni au corps de l'escargot par son extrémité buccale, et on le sectionne. Le SHP s'écoule de lui-même. Un escargot de 20 à 25 g donne 0,3 à 0,5 ml de suc digestif. Le suc est conservé à la glacière à + 2°C jusqu'au moment de son emploi. Les activités enzymatiques qui nous intéressent ne varient pas avec le temps de conservation.

Nous avons choisi, malgré la rareté du produit, d'étudier les sulfatases du SHP plutôt que celles de l'hépatopancréas, plus abondant comme matière première, parce que, le SHP étant une sécrétion, les enzymes à purifier ne sont pas à débarrasser des protéines et acides nucléiques tissulaires, comme c'est le cas lorsqu'on opère sur un homogénat d'organe.

2° *Action du pH*

La sulfatase de la « clarase » (Takamine Lab.) est dénaturée à 90/100 après 5 minutes à pH 3 et totalement au bout de 10 minutes à ce même pH d'après Dzialozynski [33]. Cependant, Dodgson [25] a montré que la β-glucuronidase de *Patella vulgata* est dénaturée à pH 2,25 alors que l'arylsulfatase qui l'accompagne conserve 96/100 de son activité. Il était important d'étudier le comportement des sulfatases et de la β-glucuronidase du SHP en fonction du pH. Nous avons réalisé ces observations sur du SHP dilué à 40/100 d'une part et sur du SHP dilué à 4/1.000 d'autre part.

Des volumes de 25 ml de SHP à 40/100 sont amenés aux différents pH, le pHmètre étant étalonné au tampon phtalate pour les pH acides, au tampon borate pour les pH alcalins. Le liquide étant maintenu homogène par agitation à l'aide d'un barreau magnétique, l'addition d'acide acétique ou de soude est faite jusqu'à stabilisation du pH à la valeur désirée. Après 24 heures de repos à la température du laboratoire, le pH est mesuré et ramené à pH 5,5 (pH normal du SHP). Le volume est porté à 50 ml réalisant une dilution finale du SHP égale à 20/100.

Le même protocole est suivi pour le SHP à 4/1.000 et le temps de contact aux différents pH de même durée, la dilution finale est égale à 2/1.000.

a) pH acides

Les courbes d'inactivation en fonction des pH acides montrent qu'il n'est pas possible de dénaturer sélectivement la β-glucuronidase du SHP quelle que soit la dilution de ce dernier lors de l'action du pH (*fig. 18* et *19*).

b) pH alcalins

Au contraire des pH acides, les pH alcalins permettent une dénaturation élective de la β-glucuronidase. Elle est beaucoup plus sensible à la dénaturation alcaline que les sulfatases (*fig. 18* et *19*).

Du SHP exempt de β-glucuronidase active est préparé en utilisant cette dénaturation.

Dans un bécher placé dans un récipient où circule de l'eau thermostatée à + 37°C sont disposées les électrodes du pHmètre et versés :

— SHP	20 ml
— Eau	65 ml
Soude 0.2 N	15 ml

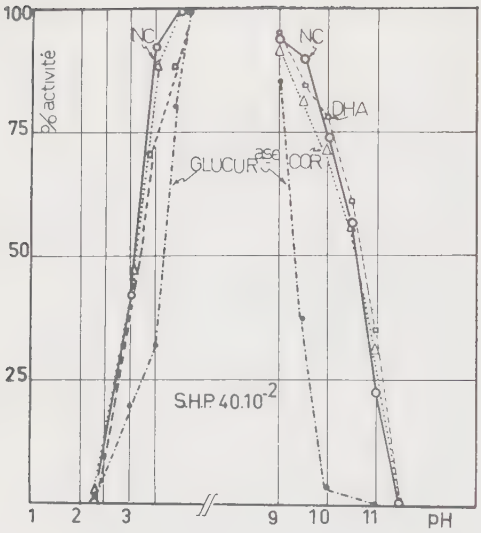


FIG. 18 : Dénaturation des sulfatases et de la β-glucuronidase du SHP, en fonction du pH (SHP dilué à 4 p. 100 v/v)

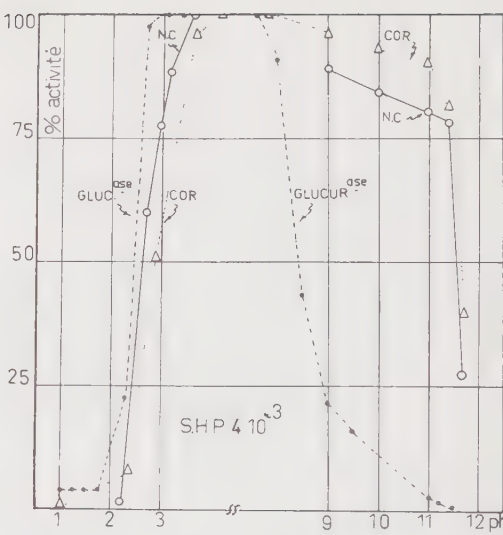


FIG. 19 : Dénaturation des sulfatases et de la β-glucuronidase du SHP, en fonction du pH (SHP dilué à 4 p. 1.000 v/v)

Une agitation magnétique assure le mélange. Le pH est égal à 11. Il est maintenu à cette valeur par addition de soude 1 N, contenue dans une microseringue Agla dont l'aiguille en verre est immergée dans le mélange. Toutes les 30 minutes, 0,1 ml est prélevé et l'activité de la β-glucuronidase mesurée par l'hydrolyse du PPG sans dilution de la prise d'essai et en limitant la durée de l'hydrolyse à 10 minutes à + 37°5 C. Dès que le terme de la dénaturation semble proche, la circulation d'eau chaude est remplacée par une circulation d'eau froide et la dénaturation poursuivie jusqu'à réaction négative avec le PPG.

Les activités enzymatiques sont ensuite déterminées après dilution convenable de la préparation. Il ne reste pratiquement plus de β-glucuronidase.

3° *Action de la température*

Les sulfatases sont plus sensibles à l'action dénaturante de la chaleur que la β-glucuronidase. La dénaturation est fonction de la concentration en protéines et du temps de chauffage.

Le SHP est préalablement équilibré à + 37°5 avant d'être prélevé et introduit dans un large tube mis auparavant au thermostat

réglé à la température désirée. Le tube est agité pendant le temps de séjour au thermostat, dès que le SHP est introduit, puis plongé dans l'eau glacée. Le volume du SHP traité est ajusté et les activités enzymatiques mesurées.

SHP dilution	*Temps en mn*	*Température en °C*	*PPG*	*PPS*	*NCS*	*DHAS*	*CORS*
2 . 10^{-3}	30	55	100 %	70,3	96,8	—	96
10^{-2}	30	55	100	93	95	100	93
10^{-2}	30	70	17,6	3,5	8,7	22	0
20 . 10^{-2}	15	65	91	17,5	27,7	19	0
»	30	65	77,6	5,25	9,5	17	0
50 . 10^{-2}	4	74	40	5	0,5	0	0

On constate que la β-glucuronidase est très résistante à l'action de la chaleur comparée aux sulfatases. Wakabayashi et Fishman [113] ont proposé d'utiliser ce moyen pour préparer du SHP exempt d'arylsulfatase active.

Ces auteurs indiquent qu'un chauffage de 15 minutes à 65°C entraîne une perte de 10/100 d'activité de β-glucuronidase et une perte de 99/100 d'arylsulfatase. Nous trouvons encore 17,5/100 d'arylsulfatase quand l'activité est mesurée par hydrolyse du PPS et 27,7/100 quand le NCS est employé.

Ils préconisent pour préparer du SHP exempt d'arylsulfatase de le porter dilué au 1/2 à 74°C pendant 4 minutes. Nous avons réalisé ces conditions et trouvé après ce traitement 5/100 d'activité arylsulfatasique par le PPS et 0,5/100 par le NCS après dilution au 1/500 pour PPS et au 1/5.000 pour NCS et une durée d'hydrolyse à + 37°5 C de 30 minutes. Il est vrai que les auteurs centrifugent le SHP après chauffage et reprennent le précipité de protéines par du tampon phosphate 0,1 M qui est un inhibiteur des sulfatases .

L'action de la chaleur permet de dénaturer les sulfatases à l'exclusion de la β-glucuronidase. Des sulfatases, la cortisone-sulfatase est la plus sensible à la chaleur.

4° *Action des solvants*

L'action dénaturante des solvants organiques vis-à-vis des protéines est bien connue. Elle est nulle si la température est suffisamment basse. Des essais d'hydrolyse enzymatique de conjugués urinaires en présence d'un solvant susceptible de dissoudre le stéroïde

libéré ayant été envisagés, nous avons étudié le comportement des enzymes étudiés après contact avec divers solvants à la température du laboratoire.

Acétone

Les protéines du SHP précipitées par l'acétone à une concentration finale de 70/100 sont dissoutes après centrifugation dans l'eau distillée et dialysées. L'activité de la β-glucuronidase est diminuée de 35/100, celles des sulfatases de 39/100.

Méthylal + Méthanol (4 : 1, v/v)

Le SHP est traité par ce mélange dans les proportions utilisées pour le dosage des lipides dans le sérum sanguin. Il n'y a pas de lipides dosables pondéralement. Le précipité dissous dans l'eau distillée et dialysé représente 64/100 de l'activité glucuronidasique et 85/100 des activités sulfatasiques du suc témoin. Nous avons vérifié que le surnageant ne contient pas de substance participant à l'activité de ces enzymes et pensé que la perte d'activité pouvait être due aux traces de formol présent dans le méthylal.

Après addition à du SHP dilué au 1/1.000 de la quantité de formol correspondant à la moitié et au double de celle qui serait susceptible de bloquer l'azote du SHP s'il était entièrement sous forme de fonctions NH_2, nous avons trouvé les mêmes activités pour la β-glucuronidase et les sulfatases que pour le suc témoin.

Benzène — Ether sulfurique — Chlorure de méthylène

Il y a absence d'inactivation par le benzène et l'éther. Après contact avec le chlorure de méthylène, le suc a conservé 80/100 d'activités sulfatasiques.

5° *Action des sels minéraux*

L'inhibition des arylsulfatases du type II par les ions sulfate, phosphate, fluorure est bien connue. Leur distinction des arylsulfatases du type I est essentiellement basée sur cette inhibition et l'absence d'action de l'ion CN^-.

Il est important de connaître le comportement de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase vis-à-vis de ces ions et en outre de comparer l'action d'une même concentration d'inhibiteur sur le SHP à différentes dilutions. On serait tenté en effet, dans le cas de l'hydro-

lyse des stéroïdes conjugués urinaires par 5 ml de SHP pour 100 ml d'urine, sachant que tel sel inhibe ses sulfatases, de penser qu'en réalisant l'hydrolyse en présence de ce dernier elle sera limitée aux seuls glucuronides.

Dans ces expériences, le sel est ajouté au SHP et après contact le pH ajusté au pH optimum de l'enzyme dont on mesure l'activité.

Concentration finale	*Activité restante %*			*Dilution SHP*
	NCS	*DHAS*	*CORS*	
PHOSPHATE				
0,0025 M	76,5	4,4	34	$2 . 10^{-3}$
0,01 M	30	5	5	$1 . 10^{-3}$
0,10 M	40	—	—	$5 . 10^{-2}$
FLUORURE				
0,0025 M	16,7	0	0	$2 . 10^{-3}$
0,01 M	0	0	0	$1 . 10^{-3}$
0,01 M	30	0	0	$5 . 10^{-2}$
SULFATE				
0,00125 M	100	58,8	12,8	$2 . 10^{-3}$
0,0025 M	100	0	6	$2 . 10^{-3}$
0,05 M	20	5	0	$1 . 10^{-3}$
0,05 M	75	0	0	$5 . 10^{-2}$
0,10 M	25	0	0	$5 . 10^{-2}$

Si pour la stéroïde-sulfatase et la cortisone-sulfatase ces trois sels sont inhibiteurs même lorsque le SHP est peu dilué, il n'en est pas de même pour l'arylsulfatase. L'inhibition disparaît après dialyse, contrairement à ce qui se passe avec l'ion sulfite.

BORATE				
0,0025 M	14,8	5	0	$2 . 10^{-3}$
0,01 M	0,3	5	0	$1 . 10^{-3}$
0,01 M	7	5	0	$5 . 10^{-2}$

L'inhibition n'est pas supprimée par le mannitol, qu'il soit ajouté avant ou après contact du SHP et du borate.

SULFITE				
0,0025 M	0	0	0	$5 . 10^{-2}$
0,00025 M	72	0	0	$2 . 10^{-3}$

Le sel anhydre est dissous dans l'eau et amené à pH 7,2 avec de l'acide chlorhydrique I N avant d'être mis en contact du SHP. L'inhibition n'est pas réversible par dialyse. L'addition d'iode au mélange SHP et sulfite en quantité suffisante pour avoir un excès visible, ne supprime pas l'inhibition. C'est le seul inhibiteur qui inhibe à la concentration de 0,0025 M l'arylsulfatase du SHP dilué à 5/100.

Cations lourds

Certaines méthodes de fractionnement des protéines sériques faisant intervenir des acétates de métaux lourds, nous avons étudié leur action sur les enzymes qui nous occupent et cherché si leur action était réversible par le versénate ajouté en quantité supérieure à la quantité théorique nécessaire pour complexer le cation.

Concentration finale	*Activité restante %*			*Dilution SHP*
	NCS	*DHAS*	*CORS*	
Zn^{++}				
0,005 M	89,7	56	55	$2 . 10^{-3}$
» + V^{te}	100	58,8	62	$2 . 10^{-3}$
Cd^{++}				
0,0075 M	89,7	56	66	$2 . 10^{-3}$
» + V^{te}	100	64,7	68	$2 . 10^{-3}$
Hg^{++}				
0,0075 M	6,6	0	0	$2 . 10^{-3}$
» + V^{te}	65,3	29,4	30	$2 . 10^{-3}$

On constate que le Hg^{++} inhibe totalement la stéroïde-sulfatase et la cortisone-sulfatase et presque complètement l'arylsulfatase. Si le versénate supprime l'inhibition des cations Zn^{++} et Cd^{++} vis-à-vis de l'arylsulfatase, il est très peu efficace dans la suppression de l'inhibition des deux autres sulfatases par ces cations. L'action du versénate est plus importante dans le cas du mercure, mais la perte d'activité enzymatique reste importante, surtout pour la stéroïde-sulfatase et la cortisone-sulfatase.

La connaissance des effets produits sur les sulfatases du SHP par le pH du milieu, par la température et par les divers agents chimiques nous permet d'aborder le fractionnement des protéines qu'il contient.

B. — FRACTIONNEMENT PAR LES SELS MINÉRAUX

Le fractionnement des protéines est classiquement abordé par la méthode de précipitation par les sels. Les conditions de précipitabilité font partie des caractères signalétiques d'une protéine. Il est fâcheux que les sels utilisés soient précisément des inhibiteurs des sulfatases et imposent dès lors des dialyses très prolongées. Aussi, après avoir sacrifié à la tradition, nous verrons la faveur à accorder aux méthodes de fractionnement par les solvants et les possibilités offertes par les adsorbants.

1° *Choix du sel*

La précipitation des protéines du SHP s'effectue sur le suc dilué à 5/100. Avant d'étudier le fractionnement par le sulfate d'ammonium, nous avons examiné ce qui précipite à pH 5 et à pH 7 par le sulfate de sodium et par le sulfate de magnésium.

Le suc dilué est placé dans un bécher, un barreau magnétique assure l'agitation du liquide, les électrodes du pHmètre plongent dans le liquide. Les sels sont ajoutés à l'état solide par petites quantités jusqu'à saturation et la pH ajusté avec de l'acide sulfurique 0,1 N ou de la soude de même normalité. Les précipités sont séparés après dix-huit heures de repos à la température du laboratoire et dissous dans l'eau distillée. Les solutions sont dialysées et des parties aliquotes de surnageant prélevées. Les résultats obtenus sont les suivants :

— Le sulfate de sodium à saturation et à pH 7 précipite 70 % de la β-glucuronidase et 40 % des sulfatases.

— Le sulfate de magnésium à saturation et à pH 5 précipite 18 % de la β-glucuronidase et 40 % des sulfatases. L'emploi de ces sels ne présente pas d'intérêt particulier, alors que le sulfate d'ammonium suivant le pH du milieu permet une élimination de la β-glucuronidase.

2° *Action du sulfate d'ammonium en fonction du pH*

Nous avons vu que la β-glucuronidase et les sulfatases du SHP sont dénaturées à pH 2 et ne le sont pas à pH 3,5, et qu'on ne peut tirer parti de cette dénaturation pour obtenir une préparation contenant seulement une des activités enzymatiques étudiées. Or, la β-glucuronidase est en partie précipitée à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium alors que les sulfatases ne le sont pas.

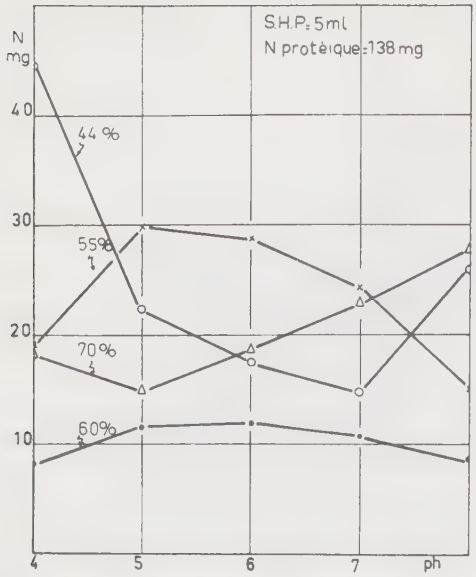


FIG. 20 : Précipitation des protéines du SHP (exprimées en mg d'N), en fonction du pH à diverses concentrations en sulfate d'ammonium

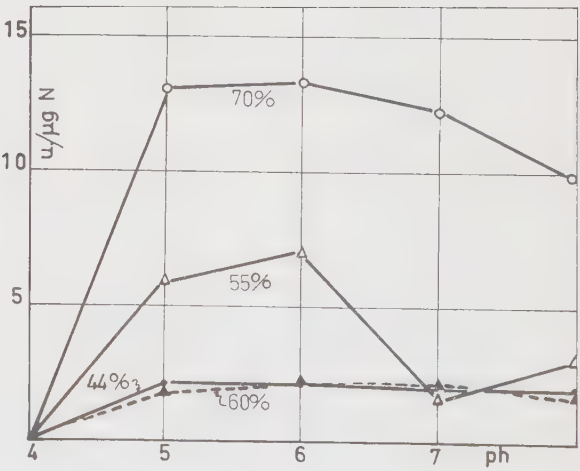


FIG. 21 : Précipitation de la β-glucuronidase du SHP, en fonction du pH, à diverses concentrations en sulfate d'ammonium

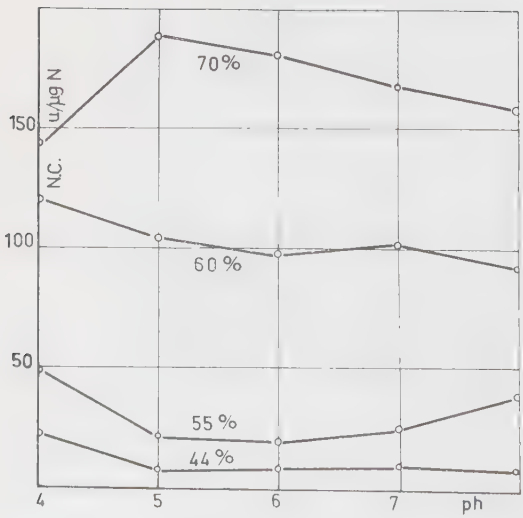


FIG. 22 : Précipitation de l'arylsulfatase du SHP, en fonction du pH, à diverses concentrations en sulfate d'ammonium

Nous avons comparé l'action du sulfate d'ammonium à 35 % de saturation à pH 3,5 et à 44 % de saturation à pH 4,2, pendant dix-huit heures à + 20°C. A pH 3,5, il ne reste plus de β-glucuronidase active et seulement 20 à 25 % des sulfatases ; mais à pH 4,2, il reste 25 % de β-glucuronidase et les activités sulfatasiques sont inchangées. Il ne faut donc pas que le pH soit inférieur à 4 si on ne veut pas altérer les sulfatases en présence de sulfate d'ammonium. C'est pour cette raison que le fractionnement par ce sel est étudié aux pH 4, 5, 6, 7 et 8.

Le SHP dilué à 5/100 est porté à 44 % de saturation en ajoutant le sel cristallisé. L'addition se fait par petites quantités avec agitation magnétique et contrôle du pH, comme il a été dit plus haut, et après dix-huit heures de repos à la température du laboratoire, les précipités sont séparés par centrifugation, à la même température, pendant vingt minutes à 7.000 g. La concentration des surnageants est portée à 55 % de saturation avec de la solution saturée de sulfate d'ammonium préparée à la température du laboratoire et ajustée au pH voulu. On laisse en contact dix-huit heures et ainsi de suite pour 60 % et 70 % de saturation. Les précipités sont dissous dans de l'eau distillée et les solutions dialysées en boyau de cellophane, d'abord contre l'eau courante, puis contre l'eau distillée. La présence de cellulase entraîne la nécessité de changer fréquemment les sacs de cellophane. On ne dépasse pas huit heures de dialyse avec un même sac. On contrôle d'abord la disparition de l'ammoniaque au réactif de Nessler et ensuite la disparition du sulfate au chlorure de baryum. Ce dernier disparaît longtemps après l'ion NH_4^+.

Résultats

1) *β-glucuronidase*

On constate qu'à pH 4, dès 44 % de saturation en sulfate d'ammoniaque, la β-glucuronidase est dénaturée. Le SHP témoin titre 7,8 unités de β-glucuronidase par µg d'azote, le précipité à 44 % de saturation ne titre plus que 0,2 unité/µg d'azote, celui à 55 % et celui à 66 % : 0,1 unité ; enfin le précipité à 70 % de saturation ne titre plus que 0,02 unité de β-glucuronidase par µg d'azote.

Une partie de la β-glucuronidase (39 %) précipite à pH 6 et à 55 % de saturation, elle est accompagnée d'une quantité relativement faible des sulfatases. Une autre partie (49 %) précipite avec la fraction la plus riche en arylsulfatase à 70 % de saturation (*Tableau I, fig. 21*).

TABLEAU I

β-glucuronidase SHP — u/μg N = 7,8 (PP)

% sat. Ste Am.	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8		
	N mg	u / µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u / µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u / µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u / µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u / µg N	total unités 10^{-3}
0	9.7	0.7	6.88	0			0			0			0		
44	44.7	0.2	10	22.3	2.1	46.72	17.5	2	36.48	14.8	2.1	31.36	26	2	52.5
55	19.1	0.1	2	29.9	5.9	176.64 (40%)	28.8	7	201.6 (39%)	24.3	1.6	39.04	15	3	45.4
60	8.2	0.1	0.91	11.5	1.9	22.4	11.9	2.1	25.1	10.7	2	22.1	8.6	1.7	15.34
70	18.3	0.02	0.42	15	13	195.84 (55.6%)	18.7	13.3	249.6 (48.6%)	22.9	12.2	280.3 (75.2%)	27.6	9.7	268.8 (70.3%)

TABLEAU II

Arylsulfatase SHP — u/µg N = 70 (NC)

% sat. Ste Am.	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8		
	N mg	u/µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u/µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u/µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u/µg N	total unités 10^{-3}	N mg	u/µg N	total unités 10^{-3}
0	9.7	0.46	89.6	0			0			0			0		
44	44.7	22.3	840	22.3	7.2	162	17.5	8.4	147	14.8	9.2	135.7	26	7.3	189
55	19.1	48.5	928	29.9	21.4	176.6	28.8	19	201.6	24.3	25	610	15	38.6	579
60	8.2	120	986	11.5	104	1200	11.9	98.7	1176	10.7	101.5	1088	8.6	90.7	784
70	18.3	144	2641 (38 %)	15	189	2835 (58.9%)	18.7	181	3398 (64.5%)	22.9	167.5	3840 (67.7%)	27.6	159	4390 (74.3%)

2) *Arylsulfatase*

La majeure partie de l'arylsulfatase précipite au delà de 55 % de saturation. La fraction la plus importante et la plus active précipite entre 60 et 70 % de saturation. La fraction précipitée à pH 5 a l'activité spécifique la plus élevée (*Tableau II, fig. 22*).

3) *Stéroïde-sulfatase*

Comme pour l'arylsulfatase, ce sont les fractions précipitées de 60 à 70 % de saturation qui sont les plus importantes et les plus actives. Il faut noter que la précipitation de la stéroïde-sulfatase n'est pas négligeable au cours des étapes précédentes. La fraction 70 % précipitée à pH 4, a l'activité spécifique maximum (*Tableau III, fig. 23*).

4) *Cortisone-sulfatase*

Elle n'est précipitée qu'à partir de 60 % de saturation. L'activité spécifique maximum apparaît dans la fraction précipitée à pH 5 (*Tableau IV, fig. 24*). L'enrichissement par le fractionnement au sulfate d'ammonium est de 19 pour la β-glucuronidase à pH 6, de 2,7 pour l'arylsulfatase à pH 4, de 4 pour la stéroïde-sulfatase à pH 4, de 4,8 pour la cortisone-sulfatase à pH 5.

Nous avons utilisé la dénaturation de la β-glucuronidase à pH acide en présence de sulfate d'ammoniaque pour obtenir des préparations exemptes de cette enzyme.

Voici le procédé suivi :

1° Le surnageant provenant de l'extraction d'une partie de la β-glucuronidase de SHP à pH 6,5 et 50 % de saturation (500 ml) est additionné d'un égal volume d'eau distillée pour être à 25 % de saturation en sulfate d'ammonium. Avec de l'acide sulfurique 1 N, on ajuste le pH à 3,5 et on ajoute du sulfate d'ammoniaque cristallisé pour réaliser 62,5 % de saturation. Dès la dissolution achevée, on centrifuge à la Sharples. Le surnageant est rejeté.

2° Le précipité est dissous dans 200 ml d'eau distillée. Cette solution a un pH égal à 4,2. On l'abaisse à 3,8 avant d'ajouter du sulfate d'ammonium cristallisé en quantité suffisante pour réaliser 55 % de saturation. On centrifuge à la Sharples et on rejette le précipité, tandis que le surnageant, amené à pH 5, est dialysé.

Le liquide obtenu ne contient plus de β-glucuronidase titrable (25 unités/ml en soixante-douze heures à + 37°5). Son activité arylsulfatasique est élevée (212 unités/γ N, 110.000 unités NC/ml). L'activité de la stéroïde-sulfatase est de 0,2 unité/γ N, celle de la cortisone-sulfatase de 5 unités par γ d'azote.

TABLEAU III

Stéroïde-sulfatase SHP — u/µg N = 0,08 (DHA)

% Saturation en Ste Am.	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8		
	N mg	u / µg N	total unités	N mg	u / µg N	total unités	N mg	u / µg N	total unités	N mg	u / µg N	total unités	N mg	u / µg N	total unités
0	9.7	0.	0	0			0			0			0		
44	44.7	0.02	1100	22.3	0.01	366	17.5	0.009	166	14.8	0.006	86	26	0.006	166
55	19.2	0.11	2132	29.9	0.06	1900	28.8	0.05	1440	24.3	0.05	1232	15	0.06	1000
60	8.2	0.16	1359	11.5	0.17	1962	11.9	0.135	1610	10.7	0.135	1450	8.6	0.09	781
70	18.3	0.34	6227	15	0.28	4320	18.7	0.23	4320	22.9	0.18	4320	27.6	0.21	5646
			(57.0%)			(50.5%)									(74.3%)

TABLEAU IV

Cortisone-sulfatase SHP — u/µg N = 3 (COR)

% sat. en Ste Am.	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8		
	N mg	u / µg N	total unités 10 -3	N mg	u / µg N	total unités 10 -3	N mg	u / µg N	total unités 10 -3	N mg	u / µg N	total unités 10 -3	N mg	u / µg N	total unités 10 -3
0	9.7	0.4	3.92	0			0			0			0		
44	447	0.23	10.56	22.3	0.33	7.36	17.5	0.29	5.2	14.8	0 36	5.36	26	0.19	5
55	19.1	0.66	12.72	29.9	0.37	11.28	28.8	0.3	88.64	24.3	0.43	10.4	15	0.63	9.5
60	8.2	1.2	9.98	11.5	0.58	6.72	11.9	0.46	5.5	10.7	0.7	7.5	8.6	0.65	5.6
70	18.3	12.7	233 (86.9%)	15	14.5	219 (89.6%)	18.7	7.9	142 (88%)	22.9	9.7	223 (90.5%)	27.6	8.9	246.4 (92.4%)

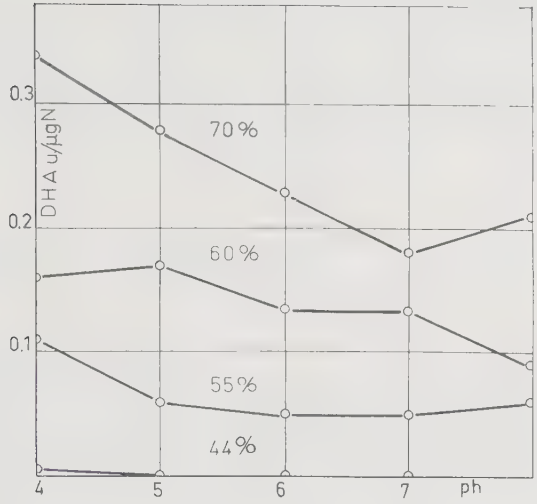


FIGURE 23 : Précipitation de la stéroïde-sulfatase en fonction du pH à diverses concentrations en sulfate d'ammonium

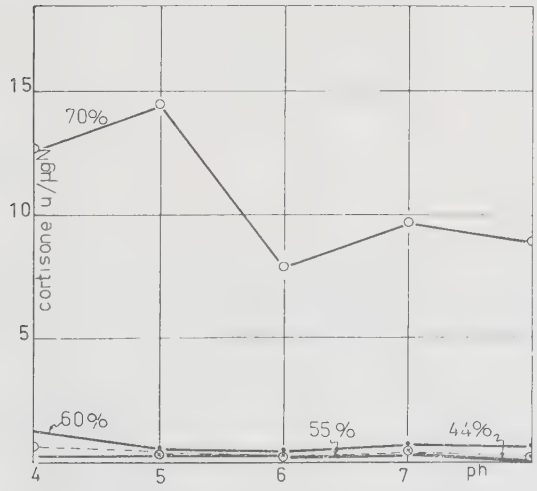


FIGURE 24 : Précipitation de la cortisone-sulfatase en fonction du pH et de la concentration en sulfate d'ammonium

Le faible enrichissement obtenu par le sulfate d'ammoniaque, joint à l'inconvénient signalé par les utilisateurs de ces préparations pour l'hydrolyse enzymatique des stéroïdes conjugués urinaires, à savoir : la présence importante de pigments gênants dans les extraits obtenus par les solvants, nous a conduit à essayer d'autres modes de fractionnement.

C. — FRACTIONNEMENT PAR L'ACÉTONE

C'est par ce solvant qu'il convient de commencer le fractionnement des protéines du SHP, car il permet d'éliminer les pigments. Après avoir déterminé le pH et la dilution les plus favorables, nous exposerons le mode opératoire retenu. Malgré le peu de sensibilité des sulfatases du SHP à l'action dénaturante des solvants à la température ordinaire, nous avons opéré le fractionnement par l'acétone à — 10°C en bac d'alcool refroidi et les centrifugations à la même température.

1° *Action du pH*

On ajoute goutte à goutte avec agitation magnétique vigoureuse 1 ml de SHP à 20 ml de mélange à parties égales d'acétone et de tampon, préalablement mis à — 10°C. On réalise ainsi une précipitation par 47,6 % d'acétone. Le tampon acéto-acétique 0,1 M est employé de pH 3,5 à 5,5, le tampon tris-maléique 0,1 M de pH 5,5 à 8,2. Après une heure de contact, on centrifuge à 7.000 g pendant vingt minutes. Les surnageants des précipités aux pH acides sont les moins colorés.

On porte alors la concentration des surnageants à 60 % d'acétone et après une heure on centrifuge. Les précipités sont dissous dans l'eau distillée et les solutions dialysées.

C'est à pH 4,5 qu'on obtient le meilleur rendement. Les fractions obtenues à 47,6 % d'acétone sont dépourvues d'activités sulfatasiques, mais tandis que les fractions de pH 3,5 à 5,5 contiennent 60 % de la β-glucuronidase, celles de pH 7 à 8,2 contiennent, dans l'ordre croissant des pH alcalins, 20 à 5 % de β-glucuronidase. La majeure partie des activités sulfatasiques sont dans les fractions précipitées à 60 % d'acétone. Parmi celles-ci, la fraction précipitée à pH 4,5 contient les sulfatases dont les activités spécifiques sont les plus élevées (*fig. 25*).

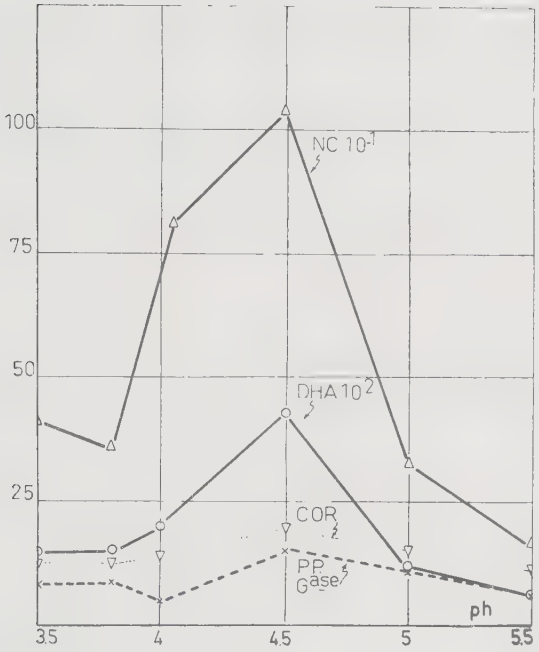


FIGURE 25 : Précipitation de la β-glucuronidase et des sulfatases en fonction du pH. Fractions précipitées de 47,6 à 60 % d'acétone. *En ordonnées* les activités.

2° *Action de la dilution*

On a comparé les résultats obtenus en faisant la première précipitation dans des conditions telles que le SHP soit amené à une dilution de 5 ou 10/100. Le rendement est le même, la dilution à 10/100 est préférable à cause du volume du premier précipité acétonique.

3° *Méthode utilisée*

On réalise successivement des concentrations d'acétone égales à 40, 46, 52 et enfin 58 %. Toutes les étapes sont conduites à — 10°C en bain d'alcool et le solvant est préalablement équilibré à cette température.

On met en œuvre par préparation 80 ml d'SHP.

1) *Précipitation à 40 % d'acétone :*

Le mélange suivant est préalablement préparé et amené à — 10°C :

— Tampon acéto-acétique 0,1 M pH 4,5 ..... 400 ml
— Acétone ..... 320 ml

80 ml de SHP refroidi à + 2°C sont ajoutés goutte à goutte au mélange acétone + tampon, dans lequel tourne l'hélice en acier inoxydable d'un agitateur mécanique. On laisse reposer au moins une heure et on centrifuge à 7.000 g pendant vingt minutes à — 10°C.

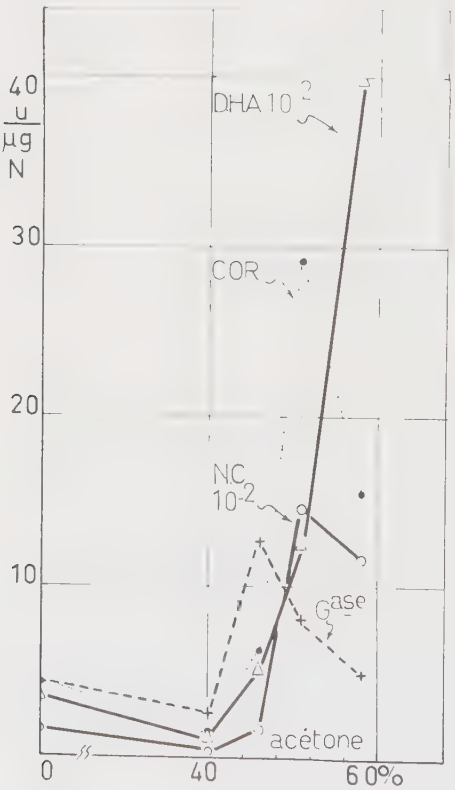


FIG. 26 : Précipitation à pH 4,5 par l'acétone de la β-glucuronidase, de l'arylsulfatase (NC), de la stéroïde-sulfatase (DHA) et de la cortisone-sulfatase (COR)

Le précipité abondant, coloré en brun foncé, est à rejeter. Le surnageant est orangé clair. Le précipité occupe un volume de 100 ± 5 ml.

2) *Précipitation à 46, 52, 58 %*

Le surnageant est additionné de la quantité voulue d'acétone, refroidie à — 10°, pour réaliser une concentration de 46 % en

acétone et le mélange laissé au repos dans le bac refroidi pendant une heure au moins, puis centrifugé et ainsi de suite.

Les précipités sont mis, aussitôt séparés, en contact avec de l'eau distillée à + 2°. On obtient des solutions limpides. Leur volume est de 200 ml pour les deux premiers précipités, de 50 ml pour les deux derniers. On dialyse une heure contre de l'eau courante, quatre heures contre de l'eau distillée refroidie.

Les essais de fractionnement en deux étapes : 46 %, puis 58 %, ne sont pas aussi bons que ceux où les quatre étapes sont respectées.

Résultats

Ils sont rassemblés dans le *Tableau V*. Le précipité à 40 % d'acétone représente 62 % de l'azote protéique du suc mis en œuvre et 44 % de sa β-glucuronidase. Les sulfatases précipitées à cette concentration représentent 10 % de l'arylsulfatase et près de 20 % de la stéroïde et de la cortisone-sulfatase.

Le précipité de 40 à 46 % d'acétone contient 30 % de la β-glucuronidase. Sa teneur en sulfatases est faible. Les deux premiers précipités contiennent ensemble 74 % de la β-glucuronidase.

Le précipité de 46 à 52 % d'acétone contient 58 % de l'arylsulfatase, 44 % de la cortisone-sulfatase et 36 % de la stéroïde-sulfatase.

Le précipité de 52 à 58 % d'acétone contient 21 % de la stéroïde-sulfatase ayant l'activité spécifique la plus élevée (*fig. 26*).

L'enrichissement en arylsulfatase est de 8,7 fois, celui de la stéroïde-sulfatase 11 fois, celui de la cortisone-sulfatase 6,6 fois.

D. — FRACTIONNEMENT PAR L'ÉTHANOL

Après avoir étudié le fractionnement par le sulfate d'ammonium, nous avons essayé les méthodes analogues à celles employées pour la séparation des protéines du sérum.

Nous avons appliqué ce mode de fractionnement d'abord au SHP, puis aux fractions actives obtenues avec le sulfate d'ammonium, et enfin aux fractions actives obtenues par l'acétone.

1° *Fractionnement direct du SHP par l'éthanol*

Il faut atteindre des concentrations élevées en éthanol pour précipiter les sulfatases.

TABLEAU V — Acétone

acétone % v/v	N mg	β glucuronidase		arylsulfatase		stéroïde – sulfatase		cortisone – sulfatase	
		u/µg N (P.P.)	total unit.10^{-3}	u/µg N (N.C.)	total unit.10^{-6}	u/µg N (D.H.A.)	total unit.10^{-3}	u/µg N (COR.)	total unit.10^{-3}
40	1150 (62%)	2.57	2.960 (44%)	27	31.2	0.01	12	1.38	1.600
46	157	12.7	2.000 (30%)	160	25.2	0.05	8.6	6.2	980
52	123.3 (6.6%)	8.1	1.000 (15%)	1458	180 (58.3%)	0.14	18 (36%)	29.2	3.600 (44%)
58	25.5 (1.4%)		125	1145	29 (9.5%)	0.4	10.35 (21%)	15.6	400 (4.9%)
S.H.P. témoin	1846.4	3.6	6.720	167	308.8	0.036	49.2	4.4	8.160
enrich^{t}		3.5 x		8.7 x		11 x		6.6 x	

TABLEAU VI — Ethanol

Ethanol % v./v.	N mg	Arylsulfatase		Stéroïde – Sulfatase		Cortisone – Sulfatase	
		u/µg N (N.C.)	total unités 10^{-6}	u/µg N (D.H.A.)	total unités 10^{-3}	u/µg N (COR.)	total unités 10^{-3}
40%	37.5	216	0.82	0.10	3.4	5.3	200
50%	37	530	19.6	0.23	8.5	9.5	350
60%	59.7 (29.6%)	1616	96.5 (56.7%)	0.68	41.– (54.6%)	24.9	1480 (47.4%)
80%	21.4 (10.6%)	1860	54 (31.7%)	1	24 (32%)	33.8	980 (31.4%)
Fraction acétone départ	201	844	170	0.37	75	15.5	3120
enrich^{t}		2.2 x		2.7 x		2.18 x	

Mode opératoire

5 ml de SHP sont dilués avec 70 ml d'eau distillée. On refroidit à la limite de la congélation et on ajoute avec agitation mécanique, comme il a été dit à propos du fractionnement par l'acétone, 25 ml d'éthanol à 80 % préalablement refroidi à — 10°C. Après un repos à — 10°C de deux heures, on centrifuge à — 10° à 7.000 g pendant vingt minutes. Le surnageant est amené successivement aux concentrations de 40, 55, 65, 70 % d'éthanol. Toutes ces opérations sont conduites à — 10°C, les temps de contact et de centrifugation sont identiques.

Les précipités sont dissous dans de l'eau distillée à + 2° aussitôt après leur séparation et dialysés contre de l'eau distillée pendant six heures.

Résultats

Les sulfatases ne précipitent qu'à partir de 65 % d'éthanol. La fraction la plus riche est la fraction 65-70 %. L'enrichissement est sensiblement le même que lors du fractionnement par l'acétone : aryl-sulfatase, 6 fois ; stéroïde-sulfatase, 5 fois ; cortisone-sulfatase, 3,3 fois.

2° *Fractionnement par l'éthanol de la fraction 60-70 % de saturation en sulfate d'ammonium*

Nous avons étudié l'influence de la force ionique et déterminé le pH optimum.

a) Force ionique

La solution du précipité actif obtenu par le sulfate d'ammonium est dialysé contre du tampon acéto-acétique au pH du SHP, soit pH 5,5. On fait varier la force ionique suivant les tables de Cohn (1928) [12]. L'alcool additionné de tampon pour maintenir la force ionique constante, est ajouté en observant les étapes indiquées plus haut.

La fraction 65-70 % a les activités spécifiques suivantes en aryl-sulfatase (exprimées en unités NC par µg d'N) :

Γ/2	*NC u/µgN*	Γ/2	*NC u/µgN*
0,006	620	0,2	477
0,02	594	0,8	477
0,10	459	1,8	204

b) pH

Nous avons cherché le pH optimum pour une force ionique de 0,006 et mesuré l'activité spécifique en arylsulfatase par hydrolyse du NCS :

Ethanol %	*pH 4,05*	*4,8*	*5,2*	*5,6*
55-65	298	182	100	60
65-70	1.030	930	800	566

En appliquant le fractionnement par l'éthanol à 90 %, additionné d'acide acétique et d'acétate de Na pour avoir pH 4,1 et $\Gamma/2$: 0,006, à une fraction obtenue de 60 à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium, les enrichissements suivants sont obtenus :

Fraction	*NC u/µg N*	*DHA u/µg N*	*COR u/µg N*
sulfate Am			
60-70 %	167	0,18	9,70
Ethanol			
55-65 %	250	0,26	12,9
65-70 %	668	0,81	26,2
Enrichissement	4 x	4 x	2,7 x

3° *Fractionnement par l'éthanol des fractions acétoniques actives*

Nous avons appliqué le fractionnement à l'éthanol aux fractions actives obtenues par fractionnement acétonique.

La fraction acétonique correspondant à 80 ml d'SHP est dialysée contre du tampon acéto-acétique de pH 4,1 et $\Gamma/2 = 0{,}006$ et amenée à 100 ml. On refroidit à la limite de congélation et on ajoute très lentement avec agitation mécanique un égal volume d'éthanol à 90 % contenant 6 ml d'acétate de Na 1 M et 24 ml d'acide acétique 1 M par litre (pH 4,1 et $\Gamma/2 = 0{,}006$) préalablement refroidi à — 10°C.

On laisse reposer deux heures dans le bac à alcool refroidi et on centrifuge vingt minutes à 7.000 g. Le surnageant est ensuite amené à 50, 60, puis 80 % d'éthanol. Le temps de contact observé est le même, sauf pour la dernière précipitation où on laisse douze heures à — 10°C. Les précipités sont dissous, aussitôt séparés dans de l'eau distillée à + 2°C et dialysés contre de l'eau distillée en chambre froide. Il arrive que la solution soit trouble. La protéine insoluble est séparée par centrifugation à + 2°C, elle est inactive.

Le *Tableau VI* indique les enrichissements obtenus. On double sensiblement les activités spécifiques des fractions acétoniques.

Ce fractionnement, appliqué aux fractions acétoniques 46-52 % et 52-58 %, donne pour chacune d'elles les mêmes enrichissements. Nous avons retenu cette façon d'opérer et soumis le SHP au fractionnement acétonique, puis au fractionnement alcoolique.

E. — ADSORBANTS

Les fractions actives obtenues par l'acétone ont été soumises à l'action de divers adsorbants.

La poudre de verre, de quartz, de cellulose, d'amidon n'adsorbent pas de pH 4 à pH 8.

Le kaolin à pH 4,6 adsorbe 20 % de la β-glucuronidase et 60 % des sulfatases, mais les résultats sont irréguliers.

Le « Filter cel » lavé à l'acide chlorhydrique, puis à la soude et à l'eau jusqu'à réaction neutre, donne une adsorption de 50 % des sulfatases en tampon acétate 0,75 M, pH 4,5, mais l'élution par gradient de concentration en tampon de pH 8 ne donne pas de résultats satisfaisants. Deux adsorbants ont retenu notre attention :

1° le phosphate de calcium ;

2° la diéthylaminoéthylcellulose (DEAE cellulose).

1° *Phosphate de calcium*

Après avoir employé le gel de phosphate de Ca et constaté l'absence d'adsorption notable de pH 5 à pH 7,7, le gel étant employé dans des proportions (gel sec/protéines) variant de 0,25 à 2,5, nous avons comparé l'emploi du gel et la formation du phosphate de Ca *in situ*, selon Ochoa (1955) [75]. Cet auteur ajoute la solution de chlorure de calcium à la solution de protéine additionnée de phosphate trisodique. Vu la dénaturation possible en pH alcalin, nous avons ajouté le phosphate trisodique à la solution protéique contenant le chlorure de calcium et employé des proportions correspondant à la quantité de gel employée dans l'expérience témoin. Le pH du milieu additionné de gel est 7,2, celui du milieu où on ajoute le phosphate trisodique au chlorure de Ca : 7,8. Les activités spécifiques dans les surnageants sont identiques, l'enrichissement est de 1,16 fois pour le gel, 1,13 par la méthode de précipitation du phosphate de Ca *in situ*. L'azote adsorbé varie de 13 à 26 %. La répétition de l'adsorption par le gel ou par la méthode d'Ochoa n'apporte pas d'amélioration.

TABLEAU VII — Phosphate de calcium

Surnageant Phosphate Ca	N mg	Glucuronidase		Arylsulfatase		Stéroïde – Sulfatase		Cortisone – Sulfatase	
		u/µg N (P.P.)	total unités 10^{-3}	u/µg N (N.C.) 10^{-3}	total unités 10^{-6}	u/µg N (D.H.A.)	total unités 10^{-3}	u/µg N (COR.)	total unités 10^{-3}
pH 7.8	32.9 (88.4%)	4.2	138.2 (75.8%)	1.32	43.5	1.2	39.48 (79%)	36	1184 (95.4%)
pH 8.3	32.6 (87.6%)	1.1	35.86 (18.2%)	1.34	43.6 (99%)	1.1.	35.86 (72%)	25	815 (65.7%)
pH 9.5	26.7 (71.7%)	3	80.1 (44%)	0.63	16.9	0.5	13.35	32	854
témoin	37.2	4.9	182.3	1.18		1.1	49.92	33	1240
enrich^{t}				1.13 x				1.09 x	

Adsorption en fonction du pH :

A des volumes équivalents (100 ml) d'une fraction acétonique de SHP contenant 245 mg de protéines, nous ajoutons :

— Solution de chlorure de calcium, 6 H_2O à 132 g/l .... 15 ml
— Solution de phosphate trisodique, 10 H_2O à 136 g/l .. 15 ml

avec agitation magnétique et contrôle du pH. Un mélange est amené à pH 7,8, l'autre à pH 8,3, le troisième à pH 9,5 avec de la soude. Le volume est complété à 150 ml avec de l'eau distillée.

On centrifuge après quinze minutes de contact et d'agitation et on mesure après dialyse l'azote et les activités enzymatiques dans les surnageants.

Le *Tableau VII* montre qu'à pH 7,8, l'enrichissement est sensiblement le même pour les trois sulfatases, tandis qu'à pH 8.3, si l'on ne perd pas d'arylsulfatase, il y a 18 % de perte en stéroïde-sulfatase et 34 % de pertes en cortisone-sulfatase, 72 % de la β-glucuronidase sont éliminés.

Nous n'avons pas retenu l'emploi du phosphate de Ca après fractionnement acétonique du SHP.

2° *Diéthylaminoéthylcellulose*

On sait la capacité considérable d'adsorption de cet échangeur d'anions vis-à-vis des protéines et la possibilité d'éluer les protéines fixées dans des conditions très ménagées de pH ou de concentration saline.

Nous avons étudié les conditions d'adsorption des sulfatases des fractions acétono-éthanoliques en fonction du pH et de la force ionique.

Nous avons employé la DEAE-cellulose de Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y.

a) Adsorption en fonction du pH

Dans de petites colonnes de 30 cm de hauteur et de 15 mm de diamètre, on introduit 1 gramme de DEAE-cellulose mise en suspension dans 50 ml de tampon. On lave l'adsorbant avec le tampon jusqu'à ce que l'effluent ait le même pH que le tampon employé.

La DEAE-cellulose a un pK' de 9,4 et nécessite, suivant le tampon, un volume plus ou moins grand de tampon pour être en équilibre avec lui.

On dépose 20 mg de protéine dialysée contre le tampon employé pour la colonne. On entraîne la protéine par le même tampon et on recueille le liquide qui s'écoule par fractions de 5 ml. On mesure dans ces fractions l'absorption à 280 mμ et les activités enzymatiques.

Nous avons employé les tampons utilisés par Ellis et Simpson [37] de force ionique 0,1.

— pH : 5,0 acétate de Na 0,1 M, ac. acétique 0,048 M
— pH : 5,5 — 0,1 M, — 0,015 M
— pH : 6,5 phosphate disodique 0,021 M, phosphate monosodique 0,0037 M
— pH : 7,5 — 0,03 M, — 0,005 M
— pH : 8,65 borate de Na 0,026 M, ac. chlorhydrique 0,022 M
— pH : 9,6 — 0,026 M, soude 0,022 M

On constate que l'adsorption est complète à pH 8,65.

b) Adsorption en fonction de la force ionique

Le borate de soude étant un inhibiteur des sulfatases, nous avons refait l'expérience précédente en employant du tampon véronal chlorhydrique.

Une solution de véronal sodique 0,1 M, dans de l'eau distillée exempte de CO_2, mélangée en proportions convenables avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N, permet d'obtenir des pH variant de 0,2 unité et par dilution de passer d'une force ionique de 0,1 à des forces ioniques de 0,05 et 0,033 par dilution au demi ou au tiers.

Nous avons réalisé les mélanges de pH 7,2 et 9,2 et les trois forces ioniques.

L'adsorption la meilleure a lieu à pH 7,9 et $\Gamma/2 = 0{,}033$.

Nous avons déterminé la capacité d'adsorption de la DEAE-cellulose employée à ce pH, pour les protéines considérées. Le protocole suivi était celui de Peterson et Sober [79] : augmentation progressive de la concentration en protéine mise en présence d'un poids déterminé d'adsorbant en suspension dans le tampon choisi. Elle est de l'ordre de 3 à 15 mg d'azote protéique par gramme d'adsorbant suivant les lots de DEAE-cellulose.

Nous verrons au chapitre troisième les résultats obtenus par chromatographie sur cet adsorbant.

Chapitre 3

ESSAIS DE SEPARATION DES SULFATASES

Les fractions obtenues par la méthode de préparation décrite pouvaient-elles être enrichies et leurs sulfatases préparées ?

Nous avons tenté d'y parvenir par les méthodes de chromatographie et d'électrophorèse. Les résultats obtenus permettent d'entrevoir la possibilité de résoudre ce problème par ces méthodes.

A. — CHROMATOGRAPHIE

Nous avons retenu la chromatographie sur DEAE-cellulose qui permet d'opérer sur des quantités relativement importantes de protéine et de procéder à leur élution dans des conditions très ménagées. Elle était réalisée en chambre froide à + 3°C.

a) Appareil

On a utilisé une colonne de 42 cm de haut et de 25 mm de diamètre, munie d'un robinet à sa partie inférieure et d'une plaque de verre fritté de porosité 0 au-dessus du robinet.

Elle permet l'emploi de 10 à 15 g de DEAE-cellulose.

Le dispositif d'élution est adapté au sommet de la colonne.

b) Mode opératoire

La DEAE-cellulose mise en suspension dans le tampon choisi est versée dans la colonne dont le verre fritté a été au préalable recouvert d'une rondelle de papier-filtre. On laisse s'écouler le tampon sans jamais laisser son niveau découvrir la surface supérieure de l'adsorbant. On lave la colonne avec du tampon jusqu'à ce que celui qui s'écoule ait le pH qu'il avait au départ. Le haut de la colonne de DEAE-cellulose est recouvert d'un disque de papier-filtre sans cendres pour éviter que l'adsorbant ne soit mis en suspension lors du dépôt des protéines.

A l'aide d'une pipette, on fait couler avec précaution près de la surface de l'adsorbant la préparation protéique dialysée contre le tampon. On règle l'écoulement et l'addition de tampon pour faire passer la préparation dans l'adsorbant. On remplit alors la colonne avec du tampon, et après passage de 300 ml de tampon, on vérifie que celui qui s'écoule ne contient pas de protéine.

On a employé du tampon véronal chlorhydrique de pH 7,9 et de force ionique 0,033.

c) Elution

L'élution par gradient est réalisée à l'aide d'un dispositif comportant deux récipients :

— un récipient de stockage de volume variable ;

— un récipient de mélange, lié directement à la colonne, contient au départ du tampon utilisé pour l'adsorption auquel vient se mélanger, par agitation magnétique, le liquide d'élution contenu dans le flacon de stockage.

Si l'on porte en ordonnées le titre de l'éluant, en abscisses le volume écoulé, on a une exponentielle si le flacon de stockage est superposé au flacon de mélange.

Si les deux récipients sont sur un même plan et communiquent par des tubulures situées latéralement près de leur fond, le titre de l'éluant croît linéairement si les volumes contenus dans les flacons sont égaux, suivant une parabole du second degré à concavité dirigée vers le haut si le volume du liquide du flacon stockeur est la moitié du volume du liquide du flacon de mélange et l'inverse si le volume du liquide du flacon stockeur est double (Lebreton [59]).

L'élution peut être réalisée par gradient de pH ou par gradient de concentration saline. L'élution par gradient de pH, réalisée avec de l'acide acétique 0,1 M, donne un passage en bloc des protéines dès que l'éluant a un pH égal à 5. Seule l'élution par gradient de concentration saline donne un fractionnement des protéines fixées. On emploie pour cette élution une solution de chlorure de sodium.

1° *Gradient exponentiel*

a) Colonne

15 g de DEAE-cellulose en tampon véronal sodique, acide chlorhydrique de pH : 7,9 et de force ionique : 0,033. Le tampon est 0,01 N en Cl^-. On dépose 87,8 mg d'azote protéique.

b) Flacons superposés

— Flacon mélangeur : 280 ml de tampon véronal.
— Flacon stockeur : 750 ml de chlorure de sodium 0,36 M.

On recueille par fractions de 10 ml au collecteur de fractions, l'écoulement étant réglé à raison d'une goutte toutes les cinq secondes.

c) Résultats

On a élué 80,7 mg d'azote protéique, soit 92 % de la quantité mise en œuvre.

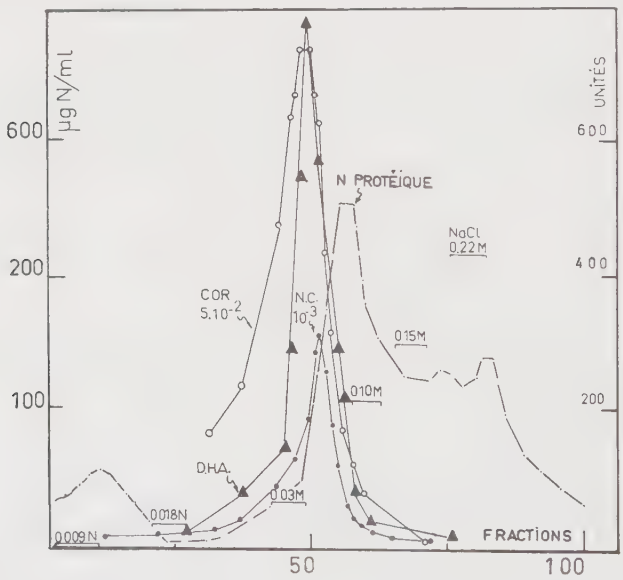


Figure 27 : Chromatographie sur DEAE-cellulose des sulfatases de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol (tampon véronal pH 7,9 ; Γ/2 : 0,032). Elution par gradient exponentiel de concentration en ClNa. DEAE : 15 g. Protéine : 1,25 g

Les sulfatases apparaissent dès que la concentration en chlorure est 0,018 M (*fig. 27*). La majeure partie passe quand la concentration en chlorure est 0,03 M. La totalité est pratiquement éluée quand l'éluant titre 0,11 M en Cl^-.

Les pics de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase sont au même niveau, celui de l'arylsulfatase légèrement en retard sur les

précédents. La quantité d'azote protéique (7,32 mg) correspondant à ces pics (fractions 45 à 52) représente 8,4 % de la quantité de protéine déposée.

Fraction déposée	*NC u/µg N 710*	*DHA u/µg N 0,30*	*COR u/µg N 10,4*
Eluat n° 45		4,2	273
— n° 47	3.720	7,2	236
— n° 49	4.975	6	195,5
— n° 50	2.840	3	102
— n° 52	810	1,18	58

L'enrichissement est de 7 fois pour l'arylsulfatase, de 23,0 fois pour la stéroïde-sulfatase, de 22,4 fois pour la cortisone-sulfatase.

2° *Gradient linéaire*

a) Colonne

10 g de DEAE-cellulose en tampon véronal sodique, acide acétique de pH 7,9, de force ionique : 0,033. L'acide chlorhydrique du tampon employé précédemment est remplacé par l'acide acétique de façon à réaliser un gradient en chlorure partant de zéro. On dépose 30,43 mg d'azote protéique.

b) Flacons communicants

— Flacon mélangeur : 600 ml de tampon véronal.
— Flacon stockeur : 600 ml de chlorure de sodium 0,2 M.

On recueille par fractions de 10 ml comme précédemment, l'écoulement est réglé de façon identique.

c) Résultats

On élue 30,13 mg d'azote protéique, soit 99 % de la quantité mise en œuvre. Les sulfatases apparaissent dès le début du passage du chlorure de sodium dont la concentration croît linéairement (*fig. 28*). Les sulfatases sont éluées en totalité quand la concentration en chlorure de l'éluat est 0,07 M. Les pics de la stéroïde-sulfatase, de la cortisone-sulfatase et de l'arylsulfatase sont au même niveau.

La quantité d'azote protéique (3,36 mg) (fractions 20 à 43) correspondant à ces pics représente 11 % de la quantité déposée. Les sulfatases passent nettement avant le pic le plus important des pro-

téines plus précocement que lors de l'élution avec gradient exponentiel en chlorure de sodium.

Fraction déposée	*NC u/µg N* 752	*DHA u/µg N* 0,42	*COR u/µg N* 17,7
Eluat n° 29	3.111	7,5	413,8
— n° 31	4.756	10,5	419
— n° 33	3.680	9,25	365
— n° 35	3.395	7,4	360

L'enrichissement est de 6,3 fois pour l'arylsulfatase, de 24 fois pour la stéroïde-sulfatase, de 23,6 fois pour la cortisone-sulfatase.

Nous nous sommes demandés ce qu'il advient si au lieu d'employer la DEAE-cellulose à la limite de son pouvoir d'adsorption, on opère sur une quantité nettement plus grande. Sur une colonne de 30 g de DEAE en tampon véronal-acétique (pH : 7,9, $\Gamma/2 = 0{,}033$), 57 mg d'N protéique d'une fraction acétono-éthanolique sont déposés. L'élution par le chlorure de sodium est réalisée comme précédemment : le flacon mélangeur contient 600 ml de tampon véronal-acétique, le flacon stockeur, communiquant avec le flacon mélangeur, 600 ml de chlorure de sodium 0,2 M. L'écoulement de l'éluat est réglé à raison d'une goutte toutes les sept secondes.

La *figure 28 bis* montre les résultats obtenus. La courbe de l'arylsulfatase comporte deux pics plus nets que dans la chromographie de la *figure 28*. Les pics de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase sont au niveau du pic le plus tardif de l'arylsulfatase. Nous avons contrôlé que le peu de β-glucuronidase présente dans la fraction protéique utilisée passe après les sulfatases.

Les fractions actives (55 à 75) représentent 9,95 mg d'N, soit 17 % de la quantité déposée sur la colonne.

Fraction déposée	*NC u/µg N* 1.044	*DHA u/µg N* 0,60	*COR u/µg N* 22
Eluat n° 55	7.120	—	203
— n° 60	8.550	9	327
— n° 62	9.050	—	363
— n° 65	6.490	8,8	464
— n° 70	6.100	11	517
— n° 75	3.940	8,00	332

Les enrichissements sont sensiblement identiques :
— 8 fois pour l'arylsulfatase ;
— 18 fois pour la stéroïde-sulfatase ;
— 23 fois pour la cortisone-sulfatase.

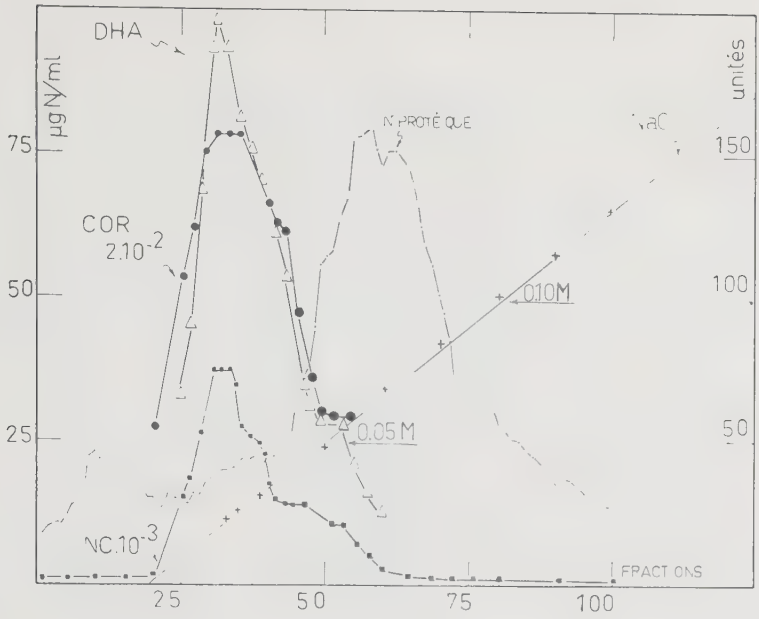


FIGURE 28 : Chromatographie sur DEAE-cellulose des sulfatases de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'alcool (tampon véronal pH 7,9 ; Γ/2 : 0,033). Elution par gradient linéaire de concentration en ClNa. DEAE : 10 g. Protéine : 30 mg d'azote protéique

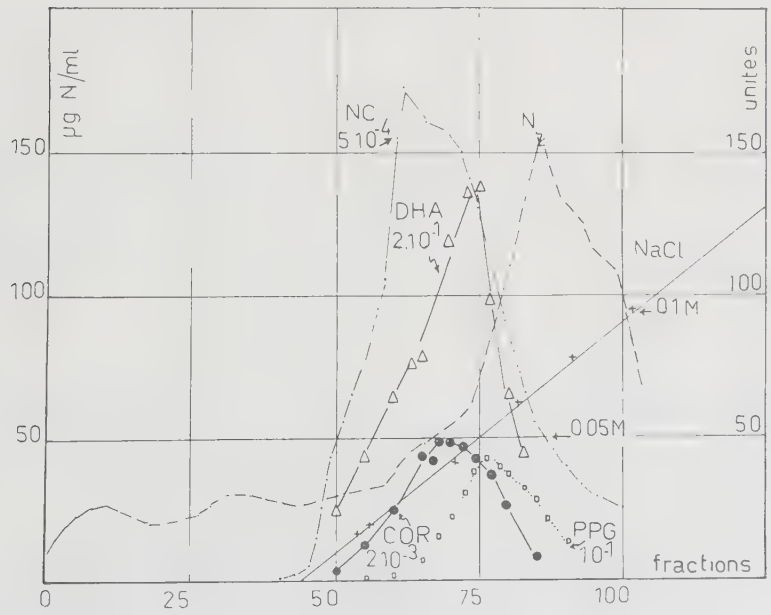


FIGURE 28 *bis* : Chromatographie sur DEAE-cellulose des sulfatases de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol (tampon véronal pH 7,9 ; Γ/2 : 0,033). Elution par gradient linéaire de concentration en ClNa. DEAE : 30 g. Protéine : 57 mg d'azote protéique. On a suivi l'élution du peu de β-glucuronidase encore présente dans la fraction active utilisée

B. — ÉLECTROPHORÈSE

Les techniques d'électrophorèse ont été appliquées aux fractions actives acétono-éthanoliques. L'électrophorèse sur papier ne nous a permis d'obtenir que des indications qualitatives. Ce n'est pas le cas des électrophorèses de zone sur amidon ou cellulose et de l'électrophorèse en gel d'amidon qui peuvent être utilisées comme méthodes de purification.

1° *Electrophorèse sur papier*

a) Technique expérimentale

Sur une bande de papier Whatman n° 2, on dépose 10 μl de préparation protéique correspondant à 100 μg d'azote. On soumet à la migration électrophorétique dans l'appareil Elphor H, à pH 8,6, dans le tampon véronal sodique de Michaelis, de force ionique 0,1, pendant quinze heures à la température de + 3°C, sous 110 volts. On met en œuvre, dans les mêmes conditions, une électrophorèse d'un sérum humain normal comme témoin.

L'électrophorèse terminée, les papiers sont mis à sécher à la température du laboratoire. Ils sont divisés longitudinalement en deux bandes égales : l'une sert à la coloration des protéines par l'Amidoschwarz 10 B ; l'autre, divisée en bandes transversales de 5 mm de large, sert à la mise en évidence des activités enzymatiques ; chaque bandelette est mise dans un tube à essai et humectée avec la quantité d'eau correspondant à la prise d'essai de solution enzymatique mise en œuvre dans les méthodes de mesure des activités exposées au *chapitre I*. On ajoute le tampon convenable et on met à l'équilibre de température à + 37°5 au thermostat avant d'ajouter le substrat équilibré lui-même à 37°5C.

b) Résultats

Les fractions acétoniques actives donnent deux bandes : une étroite un peu plus lente que les γ-globulines, une bande large couvrant l'espace correspondant aux α_2 et β-globulines et allant jusqu'au front des γ-globulines.

Les activités sulfatasiques sont localisées de part et d'autre du bord de la deuxième bande, le plus proche de la ligne de départ.

Les fractions acétono-éthanoliques donnent une large bande correspondant à la bande active précédente et une légère bande plus rapide.

Les activités sulfatasiques sont localisées dans la bande principale au même niveau que dans la deuxième bande des fractions acétoniques (*fig. 29*).

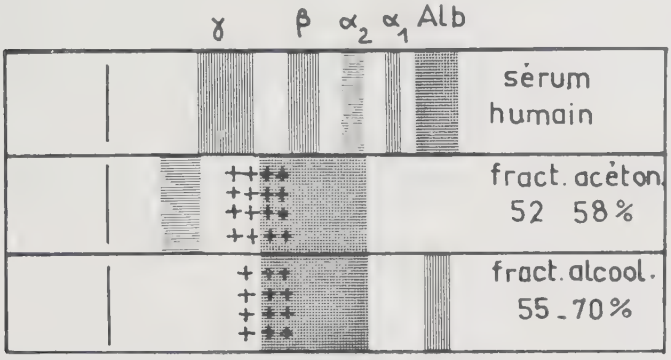


FIGURE 29 : Electrophorèse sur papier en tampon véronal pH 8,6 ; Γ/2 : 0,1, de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol

2° *Electrophorèse de zone*

1) SUR AMIDON

Nous avons réalisé l'électrophorèse en tube vertical suivant FLODIN et PORATH [42], non suivie d'une élution par flux de tampon, comme l'indiquent ces auteurs, mais d'un découpage en tranches régulières après écoulement du tampon suivant la méthode de BOURRILLON et GOT [9].

Technique expérimentale

a) APPAREIL

Nous avons utilisé l'appareil décrit par G. BOUSSIER [10], formé de deux colonnes de verre de 45 cm de haut et 25 mm de diamètre réunies à la base par un raccord en caoutchouc.

A 3 cm de leur partie supérieure, un tube de verre de 1 cm de diamètre soudé à angle droit permet de les relier chacune à un bac à électrode de platine. La colonne anodique présente à la partie inférieure un verre fritté de porosité 0 qui, recouvert d'une rondelle de papier-filtre, retient l'amidon ; elle se termine par un robinet qui permet l'écoulement du tampon après l'électrophorèse.

Celle-ci doit durer quarante heures, ce qui entraîne une électrolyse de la solution tampon et des modifications du pH, aussi avons-nous adopté le dispositif de AUGER et BOUSSIER [4] consistant en une alimentation de chaque bac à électrode par un flacon de Mariotte rempli de tampon et dont l'extrémité inférieure du tube plongeant est réglée au même niveau que la surface du tampon dans la colonne anodique. A la partie supérieure de la colonne anodique et cathodique, plongent deux tubes recourbés jouant le rôle de siphon. L'écoulement de ces siphons est réglé à l'aide d'un capillaire relié par un tube de caoutchouc. La longueur du capillaire est telle que l'écoulement se fait à raison de 30 gouttes à la minute, soit 90 ml à l'heure.

b) MODE OPÉRATOIRE

1) *Amidon :*

L'amidon utilisé est de l'amidon de pomme de terre (Bender et Hobein A.G., Zurich). Les particules trop fines sont éliminées par lavages répétés à l'eau distillée, suivis de décantations des particules en suspension. L'amidon essoré sur Buchner est lavé à l'éthanol absolu bouillant, puis séché à l'étuve à ~ 37°. On emploie, pour une colonne, 80 à 100 g d'amidon. On le met en suspension dans le tampon choisi pour l'électrophorèse.

2) *Tampon :*

L'électrophorèse de zone sur amidon est réalisé avec des tampons monovalents.

Nous avons employé trois tampons :

1° Le tampon pyridine - ac. acétique. Il est 0,77 M en pyridine, 0.316 M en ac. acétique. Son pH est 3,9, sa force ionique : 0.196. Il est dilué au 1/4 soit à une force ionique de 0.05 pour la colonne, employé tel quel pour les bacs à électrodes.

2° Le tampon acéto-acétique 0,05 M à pH 5,5.

3° Le tampon véronal sodique, acétate de sodium, chlorure de sodium, ac. chlorhydrique, de pH 8,4, de force ionique 0,05. Il est dilué au demi pour la colonne.

3) *Remplissage de la colonne :*

Il est réalisé de deux façons suivant le pH du tampon employé.

1° Quand l'électrophorèse est faite en tampon peu acide ou alcalin, on remplit la colonne en deux temps. D'abord jusqu'à la moitié de sa hauteur. On laisse l'amidon sédimenter trois ou quatre heures.

On fait couler le tampon surnageant par le robinet de la colonne jusqu'à ce qu'il affleure l'amidon. On dépose avec précaution la solution de protéines (2 ml contenant 10 à 20 mg d'azote). On fait passer la prise d'essai dans l'amidon en réglant l'écoulement. Dès qu'il n'y a plus de liquide au-dessus de l'amidon, on met à la pipette 10 à 20 ml de tampon. On fait à nouveau couler le liquide de la colonne de façon à entraîner les protéines à 2 cm au-dessous du niveau de l'amidon. On ferme le robinet et on achève de remplir la colonne avec la suspension d'amidon. On laisse reposer trois heures pour que l'amidon sédimente.

2° Quand l'électrophorèse est faite en tampon de pH inférieur à 4, la colonne est remplie en une seule fois avec l'amidon en suspension dans le tampon. La solution de protéines est déposée en haut de la colonne en suivant le protocole indiqué précédemment.

4) *Mise en train de l'électrophorèse :*

La colonne anodique préparée est mise en communication avec la colonne cathodique remplie de tampon. On adapte les bacs à électrodes et on met en place le dispositif d'alimentation des bacs et les siphons capillaires. On applique aux électrodes une tension continue de 500 V. L'intensité est de 10 mA. On laisse l'électrophorèse se poursuivre quarante heures à + 3°C.

5) *Elution :*

L'électrophorèse terminée, le courant est coupé, la colonne d'amidon est séparée de son bac à électrode et de la colonne cathodique. On la place sur un support et son robinet étant ouvert, on laisse s'écouler le tampon qui imprègne l'amidon pendant trois heures. On fait sortir le boudin d'amidon à l'aide d'air comprimé appliqué à la base de la colonne. On règle la pression pour que l'éjection soit très douce. On découpe des tranches de 1 à 2 cm d'épaisseur que l'on recueille dans des béchers de 30 ml.

Chaque tranche est éluée sur verre fritté par 10 ml de bicarbonate de potassium 0,02 M employés en deux fois. Sur le liquide d'élution, on dose l'azote au microkjeldahl ou par la méthode de Lowry après étalonnage avec la fraction protéique utilisée et on mesure les différentes activités enzymatiques.

c) Résultats

On récupère 80 à 97 % de l'azote protéique soumis à l'électrophorèse.

Les fractions les plus actives représentent 12 à 15 % des protéines.

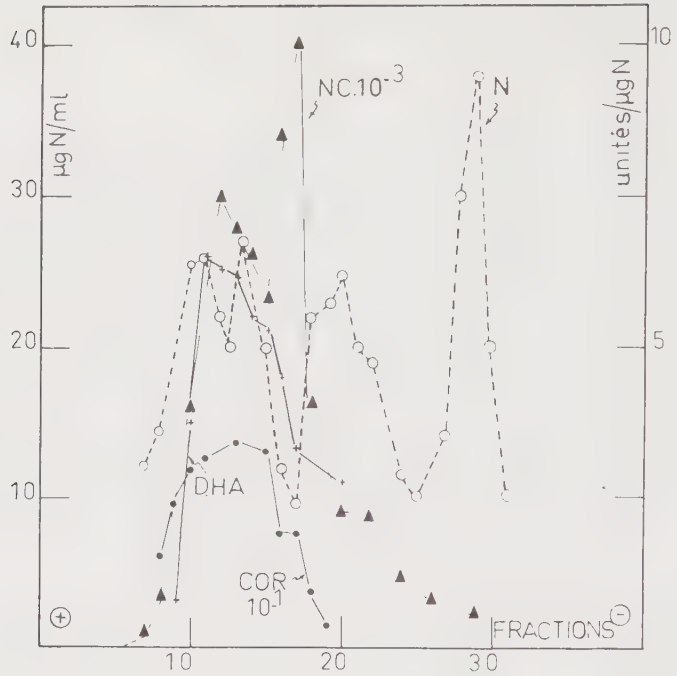


FIGURE 30 : Electrophorèse de zone sur amidon, en tampon pyridine (0,77 M), ac. acétique (0,32 M), pH 3,9, Γ/2 : 0,2, de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol

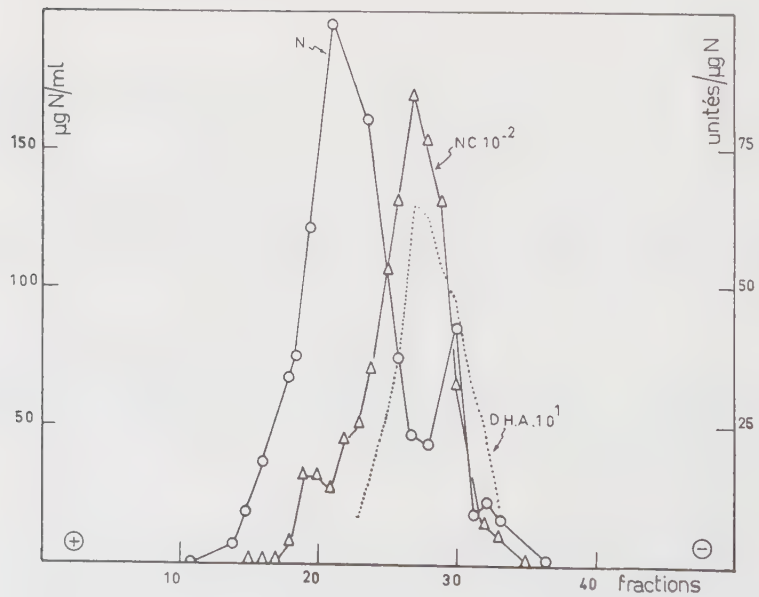


FIGURE 31 : Electrophorèse de zone sur amidon, en tampon acéto-acétique 0,05 M, pH 5,5, de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol

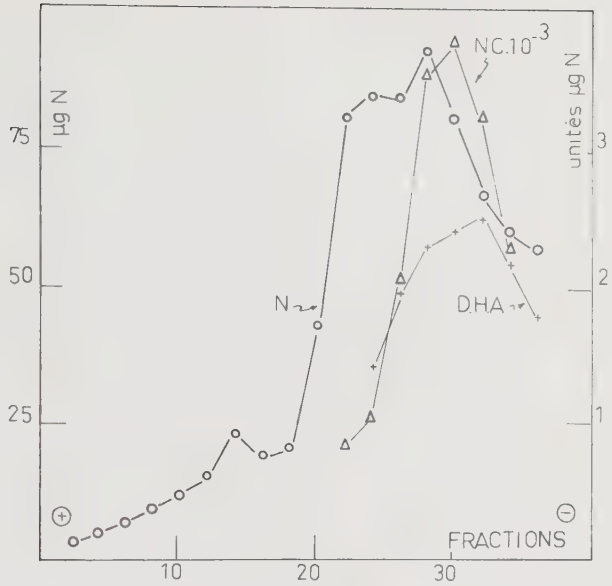


FIG. 32 : Electrophorèse de zone sur amidon, en tampon véronal pH 8,4, Γ/2 : 0,05, de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol

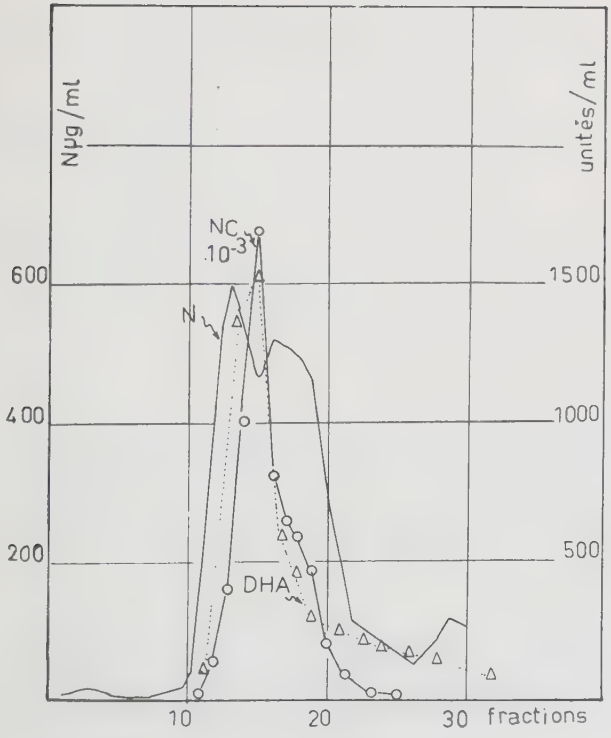


FIG. 33 : Electrophorèse de zone sur cellulose éthanolysée, en tampon véronal 0,05 M, pH 8,6, de la fraction active obtenue après fractionnement du SHP par l'acétone, puis par l'éthanol

Les meilleures séparations ont été obtenues en tampon pyridine de pH 3,9 (*fig. 30*). En tampon acétique de pH 5,5, la migration est faible (*fig. 31*). En tampon véronal de pH 8,4 (*fig. 32*), il en est de même et la séparation des protéines est peu efficace. Alors qu'en tampon pyridine on peut dénombrer quatre ou cinq pics de protéines, en tampon véronal trois seulement apparaissent.

L'arylsulfatase donne régulièrement deux pics — ce qui indiquerait la présence de deux protéines ayant cette activité. Roy [89] a obtenu le même résultat avec l'arylsulfatase dans sa préparation de stéroïde-sulfatase de Patella. La stéroïde-sulfatase est au même niveau que l'arylsulfatase. Il semble qu'il y ait aussi deux protéines douées de cette activité.

L'enrichissement était surtout important dans les électrophorèses à pH 3,9 :

— départ	NC	u/µg N =	2290,	fraction active	10.139	soit	4.4 x
—	DHA	u/µg N =	0.82,	fraction active	6.5	soit	7.9 x
-	COR	u/µg N =	10.87		et 33.9	soit	3.1 x

En tampon acétate ou véronal, les activités étaient seulement doublées.

II) SUR CELLULOSE ETHANOLYSEE

Nous avons réalisé l'électrophorèse en tube vertical suivant Gedin et Porath [45].

Technique expérimentale

a) Appareil

Il est le même que pour l'électrophorèse sur amidon.

La colonne a 60 cm de long et 30 mm de diamètre.

b) Mode opératoire

1) *Cellulose :*

Nous avons préparé la cellulose éthanolisée, suivant Flodin et Kupke [41], à partir de coton hydrophile. Il est soumis à l'ébullition à reflux, pendant vingt-quatre heures, avec de l'éthanol absolu rendu 1 N en acide chlorhydrique avec du gaz chlorhydrique sec, puis lavé à l'eau distillée et à l'éthanol avant séchage.

2) *Tampon :*

Nous avons employé le tampon acétoacétique 0,05 M, pH 6,0, et le tampon véronal 0,05 M, pH 8,6.

3) *Electrophorèse :*

La colonne est remplie de 90 g de cellulose mise en suspension dans le tampon. On dépose la solution de protéines (2 ml = 20 à 30 mg d'azote). On applique aux électrodes une tension continue de 450 V, pendant dix-sept heures.

4) *Elution :*

Nous l'avons faite avec le tampon employé pour l'électrophorèse en recueillant l'éluat par 5 ml au collecteur de fractions.

c) Résultats

Le rendement en azote protéique est de 75 à 80 %. La séparation des protéines est moins bonne que celle obtenue par l'électrophorèse sur amidon (*fig. 33*).

Les activités spécifiques de l'arylsulfatase étaient doublées, celles de la stéroïde-sulfatase quintuplées :

— NC	u/µg N :	1930	après électrophorèse		pH 8,6 :	4.370	soit	× 2
—	—	1930	—	—	pH 6,0 :	4.720	—	× 2,4
— DHA	u/µg N :	0,68	—	—	pH 8,6 :	3,5	—	× 5
—	—	0,68	—	—	pH 6,0 :	3,1	—	× 4,6

3° *Electrophorèse en gel d'amidon*

On connaît le pouvoir de résolution considérable de l'électrophorèse en gel d'amidon décrite par Smithies [96] et adaptée à la purification des protéines par Moretti [65].

Nous avons séparé dans les fractions actives acétono-éthanoliques d'SHP la β-glucuronidase (bande unique) des sulfatases (trois bandes). L'élution est réalisée en faisant migrer les protéines par électrophorèse à travers du coton de cellulose jouant le rôle de piège.

Technique expérimentale

Nous suivons les indications de Moretti quant au choix de l'amidon, à son hydrolyse partielle, à la préparation du gel et à l'appareillage.

a) Appareil

1) *Préparation du gel :*

Le gel est préparé avec du tampon borate 0,03 M de pH 8,9. Le gel obtenu a un pH de 8,5. Il est coulé dans une cuve en Afcodur de 20 mm de longueur, 45 mm de largeur, 23 mm d'épaisseur. Elle com-

porte un couvercle et deux cadres mobiles ayant chacun 4 mm d'épaisseur. La partie inférieure solidaire du fond de la cuve est fixe et a 15 mm de profondeur. Pour remplir une telle cuve, nous employons 40 g d'amidon et 255 ml de tampon. Le gel est utilisable après quatre ou cinq heures de refroidissement à la température du laboratoire.

L'insertion de la préparation de protéines est faite de la façon suivante : à l'aide d'une lame d'acier inoxydable découpée de façon à laisser intacts 5 mm de chaque côté du gel et 3 mm dans le fond, une fente transversale est faite à 70 mm d'une extrémité du gel. La préparation de protéine y est introduite soit sur un rectangle de papier Whatman préalablement imprégné de la solution, soit sous forme d'une pâte obtenue en mélangeant la solution avec un peu d'amidon. On peut insérer ainsi 20 à 25 mg de protéines (*fig. 34*).

2) *Electrophorèse :*

Le gel d'amidon est relié aux bacs à électrodes d'un appareil Elphor E par des ponts de coton de cellulose ayant la largeur du gel. Une extrémité de la bande de coton est introduite dans une cavité ménagée à l'extrémité du gel, l'autre plonge dans le tampon borate 0.3 M, pH 8.5, qui remplit les bacs. Une tension continue stabilisée à 4 volts/cm est appliquée pendant dix-huit heures en chambre froide à + 3°C. L'intensité du courant qui traverse le gel est de 2,5 mA/cm (*fig. 34*).

L'électrophorèse terminée, le couvercle est retiré ainsi que le premier cadre mobile et une première tranche de gel est découpée longitudinalement avec un fil de nylon. Elle est colorée à l'Amidoschwarz. Une deuxième tranche est découpée après avoir enlevé le deuxième cadre mobile. Elle sert à la localisation des enzymes (*fig. 35*).

Avant ces deux prélèvements, des encoches-repères sont faites sur les bords du gel.

Les bandes de protéines étant localisées par coloration dans la première tranche, de petits cubes de gel sont découpés dans la deuxième tranche aux niveaux correspondants et mis à incuber au thermostat en présence du substrat et du tampon requis pour chaque enzyme.

3) *Elution :*

Elle est réalisée par une nouvelle électrophorèse à travers du coton de cellulose ; c'est pourquoi au-devant de la protéine à piéger, on découpe et enlève une bande transversale de gel de 15 mm sur toute la largeur de la cuve et jusqu'au plancher de celle-ci. Elle est rem-

FIG. 34 : Appareillage pour électrophorèse en gel d'amidon. Cuves et accessoires.

En haut : cuve contenant un gel, montrant la fente d'insertion, la fosse garnie de coton et les ponts de coton.

En bas : les diverses parties de la cuve, le couteau et l'emporte-pièce pour l'insertion, les plaques perforées rectangulaires et carrées utilisées pour maintenir le coton dans la fosse.

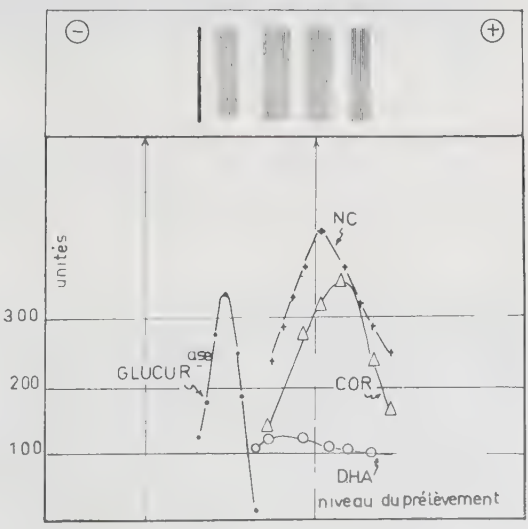


FIG. 35 : Localisation des activités enzymatiques après électrophorèse en gel d'amidon.

placé par du coton, imbibé de tampon borate 0,03 M, pH 8,5, juste avant la mise en marche de l'électrophorèse. Les bords de la cavité sont protégés avant la mise en place du coton par deux petites plaques rectangulaires en plexiglass percé de nombreux trous de 1 mm de diamètre. L'ensemble est soumis à nouveau à l'action du courant continu dans les mêmes conditions. Le coton est prélevé et remplacé toutes les trois heures, afin que la protéine passée dans le coton ne passe pas dans le gel contigu (*fig. 36*).

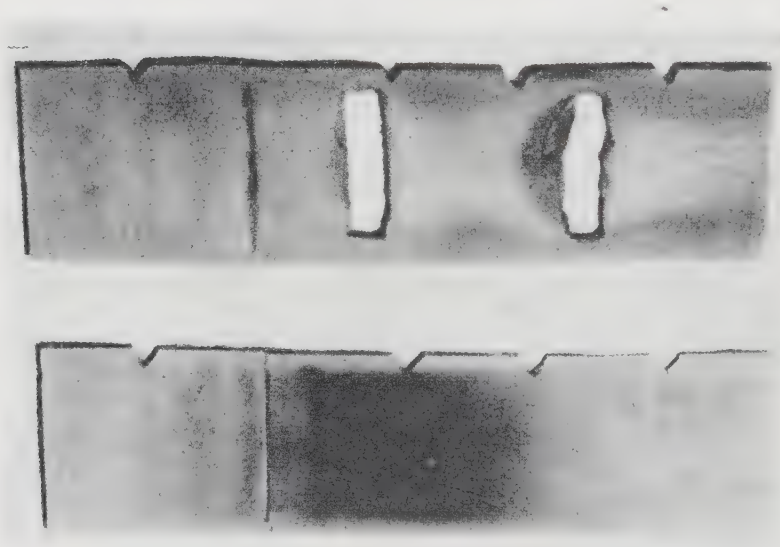


Fig. 36 : Electrophorèse en gel d'amidon.
En bas : coloration d'une tranche horizontale de gel, après électrophorèse.
En haut : coloration d'une tranche horizontale de gel, après piégeage de la β-glucuronidase (première fosse) et des sulfatases (deuxième fosse).

Les cotons prélevés sont mis dans des petits béchers, puis essorés sur un petit filtre en verre fritté de porosité 0 placé sur une fiole à vide au-dessus d'un tube à essai dans lequel le tube d'écoulement du filtre est engagé. Chaque coton est introduit dans le filtre à l'aide d'une pince, tassé de façon à chasser la plus grande partie du tampon qui l'imbibe. On fait le vide pour l'essorer complètement. On interrompt le vide et on recouvre le coton d'eau bidistillée. On laisse le

coton s'imbiber de lui-même, puis on fait le vide, on répète deux fois le lavage du coton. On arrive ainsi à recueillir un volume de 10 ml environ.

Le borate étant un inhibiteur des sulfatases, est éliminé par dialyse contre de l'eau distillée, puis bidistillée jusqu'à ce que la réaction à la quinalizarine soit négative.

b) Résultats

L'électrophorèse en gel d'amidon au tampon borate a donné la meilleure résolution des protéines des fractions actives acétono-éthanoliques. On obtient essentiellement, comme le montre le cliché de la *figure 35*, en partant de la cathode vers l'anode, à partir de la ligne d'insertion, une première bande : la β-glucuronidase, puis trois bandes où sont rassemblées les sulfatases.

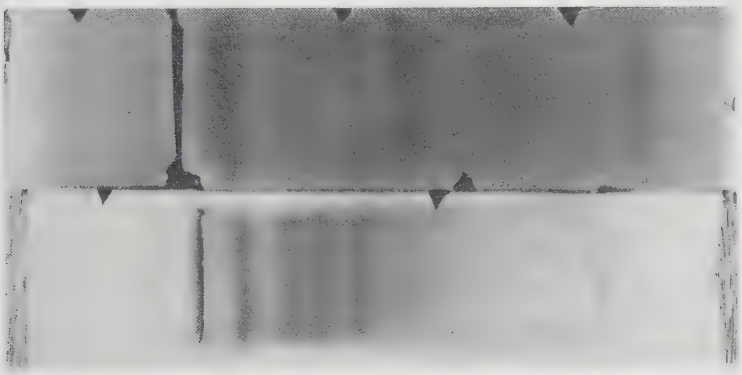


Figure 37 : Influence de la quantité de protéine insérée et de la durée de l'électrophorèse en gel d'amidon sur la netteté des bandes obtenues (tampon borate 0,03 M, pH 8,4, 4 v/cm, 2,5 mA/cm)

En haut : 6 mg d'azote protéique, 22 heures

En bas : 4 mg d'azote protéique, 17 heures

La netteté des bandes obtenues dépend de la quantité de protéines soumises à l'électrophorèse, comme le montre la *figure 37*. Le gel inférieur a été obtenu après électrophorèse sous 80 volts pendant dix-sept heures, de 4 mg d'azote protéique ; le gel supérieur après électrophorèse sous 80 volts pendant vingt-deux heures de 6 mg d'azote protéique. Quant à celui de la *figure 38*, 10 mg d'azote protéique avaient été insérés dans le gel.

La localisation des enzymes opérée, comme nous l'avons dit plus haut, est la suivante : en allant de la ligne d'insertion vers l'anode, au niveau de la première bande est rassemblée toute la β-glucuronidase ; au niveau de la deuxième bande, se situe le maximum d'activité de la stéroïde-sulfatase ; celui de l'arylsulfatase au niveau de la troisième bande.

La cortisone-sulfatase a son maximum d'activité au niveau de l'intervalle compris entre la troisième et la quatrième bande (*fig. 35*).

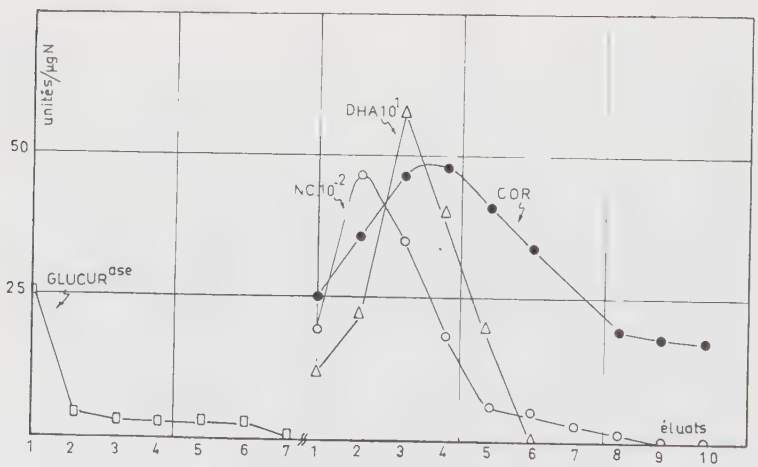


FIGURE 38 : Piégeage par électrophorèse à travers coton de la β-glucuronidase et des sulfatases, deux fosses étant pratiquées, l'une au-devant de la β-glucuronidase, l'autre au-devant des sulfatases

L'élution séparée de la β-glucuronidase et des sulfatases a permis de récupérer (3,09 mg/4,45 mg) 69 % de l'azote protéique mis en œuvre. Si on tient compte du gel prélevé pour la coloration et la localisation des enzymes, on arrive à un rendement de 90 %.

Le *tableau VIII* indique les activités spécifiques de chaque enzyme dans les éluats des 10 cotons prélevés à des intervalles de trois heures d'électrophorèse et les enrichissements réalisés.

La *figure 38* montre l'apparition successive de l'arylsulfatase, de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase au cours de la deuxième électrophorèse après mise en place de cotons pièges.

TABLEAU VIII — Elution d'un gel d'amidon

Eluat des cotons	N.C. u/µg N 10^{-2}	D.H.A. u/µg N	COR. u/µg N	Glucuronidase u/µg N
1	19	1.2	25	26
2	47	2.2	36	4.5
3	35	5.8	47	3
4	18.5	4	48	3
5	6	2	41	3
6	5	1	37	3
7	3	-	30	1
8	1.5	-	18.5	0
9	0	-	17.8	0
10	0	-	17.5	0
activité initiale	15.8	1.7	30	7
enrich^{t}	2.9 x	3.4 x	1.6 x	3.7 x

C. — MÉTHODE DE PRÉPARATION DES SULFATASES

De l'étude qui précède, il ressort que l'obtention de fractions protéiques à activités sulfatasiques élevées peut être réalisée en traitant successivement le SHP par l'acétone et l'éthanol, et en soumettant les fractions actives ainsi obtenues à une chromatographie sur DEAE-cellulose.

Les électrophorèses sur amidon ou cellulose éthanolysée ne donnent pas de résultats supérieurs à la chromatographie sur DEAE-cellulose et l'électrophorèse à travers un gel d'amidon sera à réserver à une ultime purification.

Le protocole de préparation comporte les opérations suivantes :

1° *Fractionnement par l'acétone à — 10°C*

80 ml d'SHP sont ajoutés avec agitation au mélange suivant, refroidi à — 10° :

— acétone : 320 ml ;

— tampon acéto-acétique 0,1 M, pH 4,5 : 400 ml.

La concentration finale en acétone est donc de 40 %.

Le précipité séparé est éliminé. Le surnageant, amené à 46 % d'acétone par addition du mélange refroidi : acétone 128 ml, eau distillée 50 ml, donne un précipité également rejeté. Le surnageant est porté à 52 % d'acétone par addition du mélange refroidi : acétone 118 ml, eau distillée 30 ml. Le précipité obtenu dissous dans 50 ml d'eau distillée est soumis à la dialyse contre du tampon acéto-acétique de pH 4,1 et $\Gamma/2$ 0,006 et le volume amené à 100 ml après cette opération. La concentration du surnageant du précipité à 52 % est portée à 58 % d'acétone par addition de 116 ml d'acétone à — 10°C et le précipité obtenu dissous et dialysé comme le précédent. Le volume final est également de 100 ml.

2° *Fractionnement par l'éthanol à — 10°C*

On utilise de l'éthanol à 90° additionné d'acide acétique et d'acétate de sodium pour avoir un pH = 4,1 et $\Gamma/2$ = 0,006.

Les fractions acétoniques actives (100 ml) sont additionnées de l'éthanol à 90° pour avoir une concentration égale à 40 %.

Le précipité obtenu est éliminé, le surnageant amené à 50 % d'éthanol. Le précipité est éliminé et le surnageant amené à 60 %.

Le précipité obtenu est dissous dans 25 ml d'eau distillée, soumis à la dialyse et le volume amené à 50 ml. La concentration en éthanol du surnageant est portée à 70 %, le précipité obtenu est dissous, dialysé et le volume de la solution amené à 50 ml.

3° *Chromatographie sur DEAE-cellulose*

Les fractions éthanoliques actives sont concentrées en chambre froide par ventilation et déposées sur une colonne de DEAE-cellulose en tampon véronal sodique - acide acétique de pH 7,9 et $\Gamma/2 = 0{,}033$.

L'élution est réalisée par un gradient linéaire de concentration en chlorure de sodium réalisé par alimentation de la colonne à l'aide d'un flacon mélangeur contenant un volume de tampon véronal égal au volume de chlorure de sodium 0,2 N contenu dans le flacon stockeur de même capacité que le flacon mélangeur. Les flacons sont sur le même plan et communiquent par une tubulure située à leur base.

L'éluat est recueilli au collecteur de fractions. On recueille 100 fractions de 10 ml. Les activités sulfatasiques sont rassemblées dans 20 fractions.

Résultats

La fraction acétonique 52 % est la plus riche en arylsulfatase et en cortisone-sulfatase, celle à 58 % est la plus riche en stéroïde-sulfatase.

C'est la raison pour laquelle il est souhaitable de les soumettre séparément au fractionnement par l'éthanol. Elles représentent ensemble 8 % de l'azote du SHP.

La fraction éthanolique la plus active est la fraction à 70 % et les activités sont régulièrement doublées pour les trois sulfatases quelle que soit la fraction acétonique traitée. La fraction éthanolique à 60 % est sensiblement moins active, mais avec la précédente, elles représentent la majeure partie des activités sulfatasiques. L'azote qu'elles contiennent correspond à 3 % de l'azote du SHP.

Les fractions actives obtenues par chromatographie contiennent 1 % de l'azote du SHP soumis au fractionnement.

Les enrichissements finals réalisés calculés sur 10 fractionnements différents :

	NC u/µg N	*DHA u/µg N*	*COR u/µg N*
SHP	130	0,05	3,5
Produit final	6.200	6,8	390
Enrichissement	48 x	136 x	110 x

D. — NATURE DES PROTÉINES ACTIVES

Les protéines du SHP ont une teneur élevée en glucides. Il était important d'en suivre la variation au cours du fractionnement.

La fraction active obtenue après chromatographie sur DEAE-cellulose a été étudiée comparativement à la fraction alcoolique de départ quant à la teneur en azote polypeptidique et en azote total. L'identification des sucres a été faite par chromatographie. La courbe d'absorption dans l'ultra-violet a permis de déterminer la teneur en tyrosine et en tryptophane.

Les hexoses sont déterminés par la méthode à l'orcinol de LUSTIG et LANGER modifiée par WEIMER et MOSHIN [117] contre un mélange équimoléculaire de galactose et de mannose, les 6-désoxyhexoses par la méthode de DISCHE et SHETTLES [15] au chlorhydrate de cystéine et acide sulfurique contre une solution de fucose. La glucosamine est dosée par la méthode d'ELSON-MORGAN [38] modifiée par RIMINGTON [83] après 4 heures d'hydrolyse à + 100° en milieu acide chlorhydrique 3 N (*).

Les résultats sont rassemblés dans le *Tableau IX*.

La méthode de SOMOGYI et NELSON effectuée, sans hydrolyse préalable, sur les fractions acétoniques et éthanoliques, montre qu'il existe moins de 300 μg de sucres par ml dosés par leur fonction réductrice libre.

Il n'a pu être mis en évidence d'acide sialique. Le rapport hexoses/N et 6-désoxyhexoses/N s'élève dans les fractions actives. Ces rapports sont voisins pour les fractions actives obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose et par électrophorèse sur amidon.

La teneur en azote polypeptidique a été déterminée par la méthode de GORNALL [50] en utilisant de la sérum-albumine pure comme étalon.

La fraction alcoolique active contient 81,5 % de polypeptides, sa teneur en azote est de 11 %.

Les fractions actives provenant de deux fractionnements différents achevés par chromatographie sur DEAE-cellulose sont précipitées par 80 % d'éthanol, après dialyse contre de l'eau bidistillée. Les précipités, lavés à l'éther anhydre sur sodium, sont conservés dans un exsiccateur jusqu'à poids constant. Trois prises d'essai de chaque produit sont soumises aux dosages des polypeptides et de l'azote total.

(*) Ces dosages ont été effectués par notre collègue R. GOT que nous tenons à remercier.

TABLEAU IX — Teneur en hexoses et hexosamines du SHP et des fractions obtenues par l'acétone, puis par l'éthanol et par chromatographie sur DEAE-cellulose ou électrophorèse en gel d'amidon

Fraction	N µg / ml	HEXOSES µg / ml	HEXOSES Total mg	6 – désoxy-hexoses µg / ml	6 – désoxy-hexoses Total mg	Hexoses / N	6-désoxy-hexoses / N	glucosamine µg / ml
S.H.P. départ	27.700	21.700	1.736	5.700	456	0.78	0.20	
ACETONE 40%	2.598	2.120	1.060 (72,3%)	500	250 (64,4%)	0.81	0.19	
46%	1.885	1.520	152	480	48	0.81	0.25	
52% *	2.836	2.360	118 (8 %)	660	33 (8,5%)	0.83	0.23	1.350
58%	855	1.040	52	480	24	1.22	0.56	
63%		1.680	84	660	33			
			1.466 (84,5%)		388 (85 %)			
ETHANOL 40%	2.615	1.860		760		0.71	0.29	
50%	2.887	2.660		830		0.92	0.27	
60% *	2.557	2.900		850		1.13	0.33	1.625
70% *	565	1.300		450		2.3	0.79	
D.E.A.E	250	430		74		1.72	0.296	
AMIDON	136	212		54		1.56	0.39	

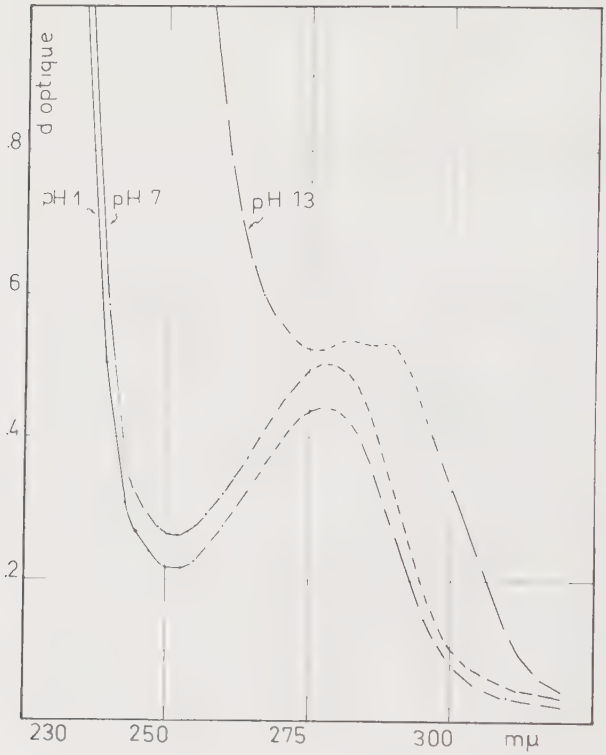


FIG. 39 : Spectres d'absorption dans l'ultra-violet de la fraction active obtenue après chromatographie sur DEAE-cellulose. Solvants : HCl 0,1 N, eau, NaOH 0,1 N

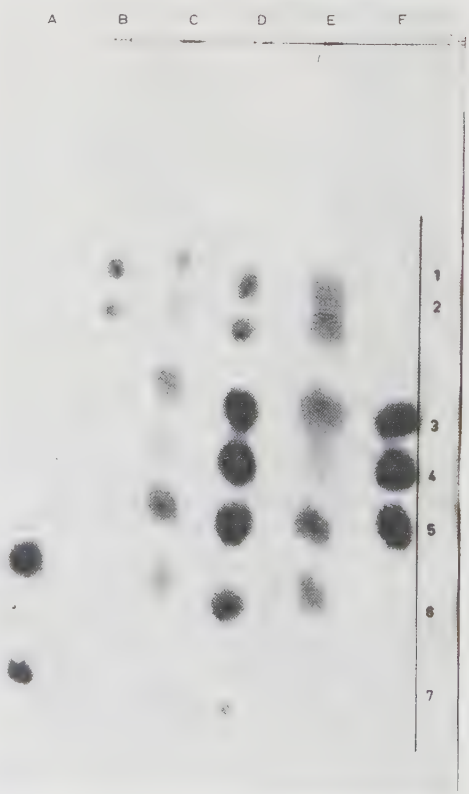


FIGURE 40 : Chromatographie des sucres réducteurs totaux de la fraction active obtenue après chromatographie sur DEAE-cellulose. Système solvant : n-butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5 : 3 : 2, v/v)

A - témoins 6 - désoxy - hexoses. 6 : fucose. 7 : rhamnose.

B - témoins hexosamines. 1 : galactosamine. 2 : glucosamine.

F - témoins hexoses. 3: galactose. 4 : glucose. 5 : mannose.

D - mélange des témoins.

C et E - hydrolysat.

La teneur en polypeptide est de 68 %.

La teneur en azote est de 9,9 %.

Des solutions, de titre connu en protéine, dans l'eau distillée, dans l'acide chlorhydrique 0,1 N, dans la soude 0,1 N ont été examinées au spectophotomètre Jobin et Yvon. Les courbes d'absorption dans l'ultra-violet représentées dans la *figure 39* ont été obtenues.

Elles ont permis de calculer un coefficient d'extinction

$$E^{1\ cm}_{1\ \%} = 9{,}05$$

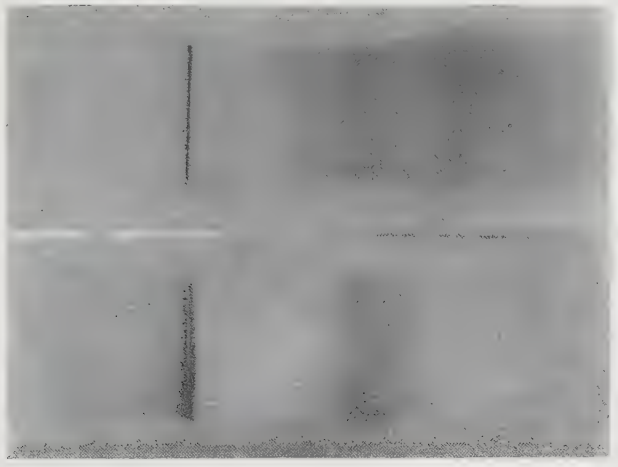


Figure 40 *bis* : Electrophorèse à travers un gel d'amidon (tampon borate 0,03 M, pH 8,4)
En haut : fraction soumise à la chromatographie sur DEAE-cellulose
En bas : fraction active obtenue

Les densités optiques de la solution à pH 13 à 2.800 et 2.944 Å (cette dernière longueur d'onde correspondant à l'égalité d'absorption pour des solutions équimoléculaires de tyrosine et de tryptophane dans la soude 0,1 N) ont permis de calculer suivant Goodwin et Morton [49] la teneur en ces deux acides aminés :

— Tyrosine ..... 5,4 %
— Tryptophane ..... 2,6 %

et le rapport :

$$\frac{M\ \text{tyrosine}}{M\ \text{tryptophane}} = 2{,}28$$

Les dosages d'hexoses, de 6-désoxyhexoses, d'hexosamines effectués sur ces mêmes protéines permettent d'indiquer les teneurs suivantes :

— Hexoses ..... 18,6 %
— 6-désoxyhexoses ..... 3,2 %
— Osamines ..... 9,5 %

L'identification des substances glucidiques, après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1 N pendant 3 heures à + 100°C est réalisée par chromatographie descendante (16 heures à + 22°C) sur papier SCHLEICHER 2043 B (lavé aux acides) dans le système n-butanol/pyridine/ac. chlorhydrique 0,1 N (5/3/2) de BOURRILLON et MICHON [64]. Des solutions de substances témoins sont chromatographiées dans les mêmes conditions. La révélation est effectuée par l'oxalate d'aniline (ac. oxalique 0,1 N : 100 ml + aniline : 0,9 ml). La *figure 40* reproduit un cliché d'une chromatographie effectuée dans les conditions indiquées. On constate la présence de deux hexosamines : galactosamine et glucosamine ; de trois hexoses : glucose, mannose, galactose ; de deux 6-désoxyhexoses : fucose et rhamnose. Les plus abondants sont la galactosamine, le mannose et le fucose.

L'électrophorèse à travers un gel d'amidon, préparé en tampon borate à pH 8,4, de cette fraction obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose est représentée par la *figure 40 bis*.

Chapitre 4

SPECIFICITE DES SULFATASES
ETUDE CINETIQUE
DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE
DES ESTERS-SULFATES

A. — STÉRÉOCHIMIE DES STÉROIDES SULFATES ÉTUDIÉS

L'hydrolyse enzymatique des esters-sulfates et en particulier des esters-sulfates de stéroïdes alcooliques ou phénoliques dépend de la structure moléculaire, aussi, rappellerons-nous brièvement ce que l'on sait de la configuration de ces molécules (cf. WEINMANN et JAYLE [118]).

Le noyau tétracyclique commun à tous les stéroïdes est celui d'un hydrocarbure dénommé gonane à 17 atomes de carbone. Il est constitué par trois noyaux cyclohexaniques (A, B, C) et un noyau cyclopentanique (D) (*fig. 41 a*).

L'hydrocarbure correspondant au gonane dont l'hydrogène du carbone C_{13} est remplacé par un groupement méthyle (— CH_3 . N° 18) est l'œstrane (*fig. 41 b*). L'hydrocarbure correspondant à l'œstrane dont l'hydrogène du carbone C_{10} est remplacé par un groupement méthyle (— CH_3 . N° 19) est l'androstane (*fig. 41 c*). L'hydrocarbure correspondant à l'androstane dont un hydrogène du carbone C_{17} est remplacé par un radical éthyle (— CH_2 — CH_3 : N° 20 — 21) est le pregnane (*fig. 41 d*).

L'œstrane est le squelette des hormones œstrogènes de l'ovaire, l'androstane celui des hormones mâles, le pregnane celui des hormones du corps jaune ovarien et des cortico-surrénales.

On voit qu'il y a six carbones asymétriques pour l'œstrane et l'androstane, sept pour le prégnane. Dans les stéroïdes naturels, les

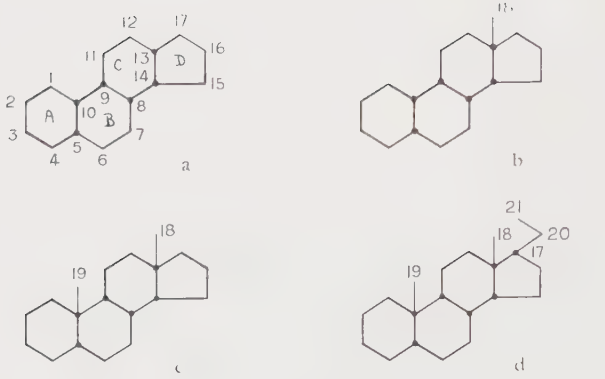


FIGURE 41

a) Gonane
b) Œstrane
c) Androstane
d) pregnane

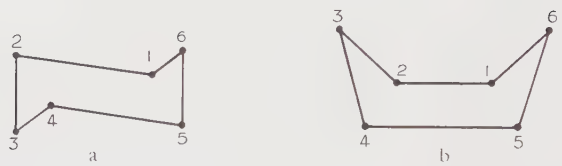
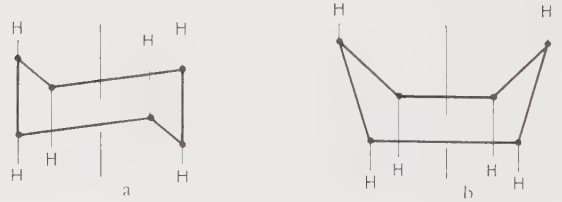
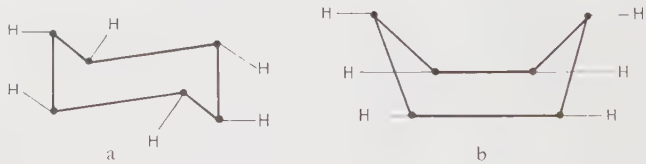


FIG. 42 : Squelette carboné du cyclohexane et liaisons carbone-hydrogène axiales et équatoriales. *a*) Forme chaise. *b*) Forme bateau





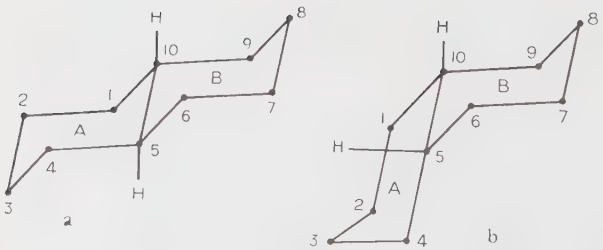


FIGURE 43

a) Trans-décalane
b) Cis-décalane

différents centres d'asymétrie ont une configuration identique à l'exception du carbone C_5 qui présente une isomérie α ou β. Les formules planes ne sont pas conformes à la réalité de la structure moléculaire. La configuration spatiale des stéroïdes qui rend compte de leur isomérie s'éclaire à la lumière des connaissances de la structure du cyclohexane, du décalane, du trans-hydrindane.

Dans le cyclohexane, le cycle de six atomes de carbone sans tension implique l'existence de deux arrangements structuraux par rapport au plan des atomes de carbone C_1, C_2, C_4, C_5 dit « équatorial ». Si les atomes de carbone C_3 et C_{10}, en conservant la numérotation des carbones du noyau du gonane, se trouvent l'un au-dessus, l'autre au-dessous, on a la forme « chaise » ; s'ils sont tous les deux au-dessus du plan, on a la forme « bateau » (*fig. 42*). La forme « chaise » est thermodynamiquement la plus stable. Les liaisons des atomes d'hydrogène ou des radicaux substitués à l'hydrogène sont dites « équatoriales » si elles sont parallèles au plan équatorial, axiales si elles sont dans une position perpendiculaire à ce plan.

Si l'on considère les deux cycles hexacarbonés accolés A et B comme dans le décalane, sous la forme chaise la plus probable, leur union peut se faire de deux façons : ou bien les deux plans équatoriaux sont parallèles — c'est la forme « trans », les liaisons $\diagdown\!\!\diagup$ C — H des carbones C_5 et C_{10} sont orientées en sens inverse (*fig. 43 a*), les hydrogènes sont axiaux par rapport à A et B, l'hydrogène en 5 est dit 5 α ; ou bien, les deux plans équatoriaux sont perpendiculaires, c'est la forme « cis » — les liaisons $\diagdown\!\!\diagup$ C — H des carbones C_5 et C_{10} ont une orientation cis. Elles sont axiales par rapport à un noyau, équatoriales par rapport à l'autre noyau. L'hydrogène en 5 est dit en β (*fig. 43 b*).

Le cycle à 5 carbones du cyclopentane comporte une déformation des angles de valence du carbone qui sont plus grands que normalement, entraînant une certaine tension dans le cycle. Lorsqu'il est accolé, comme dans le trans-hydrindane, à un cycle cyclohexanique, il se trouve déformé. C'est le cas représenté par le noyau C accolé au noyau D dans le gonane. Ces carbones C_{13}, C_{15}, C_{16} définissent un plan au-dessous duquel se trouvent les atomes de carbone C_{14} et C_{17}.

Les liaisons $-\overset{\displaystyle H}{\underset{\displaystyle H}{\overset{|}{C}\underset{|}{}}}-$ des carbones C_{15} et C_{17} sont équatoriales ou axiales suivant qu'elles sont parallèles ou perpendiculaires au plan équatorial du cycle cyclohexanique C (*fig. 44*).

Dans les stéroïdes naturels, l'isomérie des cycles B, C, D, est toujours du type trans, celle des noyaux A et B est : soit du type cis, soit du type trans. Série du 5 α et du 5 β-androstane (*fig. 45*), série du 5 α et du 5 β-pregnane (*fig. 47*).

La présence d'une ou plusieurs doubles liaisons dans le noyau tétracyclique entraîne une tension qui se traduit par une déformation. Lorsque le carbone 5 est impliqué dans une double liaison, on ne peut plus parler de forme cis ou trans. La structure est intermédiaire.

Les groupements monovalents qui seront substitués aux hydrogènes seront en position équatoriale ou axiale, or la liaison équatoriale est thermodynamiquement plus stable que la liaison axiale correspondante. Un groupement hydroxyle équatorial est plus facilement estérifié que le groupement hydroxyle axial correspondant. La même règle s'applique à l'hydrolyse des esters.

Parmi les esters-sulfates auxquels nous aurons affaire il y a des esters de dérivés oxydrilés au carbone 3. Suivant la position 3 α ou 3 β de cet oxydrile, on conçoit que le comportement sera différent s'il s'agit d'un dérivé du 5 α-androstane ou du 5 β-androstane (*fig. 46* et *46 bis*). C'est ce que l'expérience vérifie.

Un hydrogène du carbone 17 peut être substitué par un oxydrile et présenter la configuration 17 α ou 17 β. Le comportement des esters-sulfates en 17, vis-à-vis des sulfatases étudiées est particulier.

Dans les dérivés du prégnane, on trouve les configurations décrites pour les dérivés de l'androstane, mais en outre, un radical éthyle substitué à un hydrogène du carbone 17. Cette chaîne latérale est équatoriale par rapport au cycle C, c'est-à-dire en β (*fig. 47*).

Des dérivés du prégnane ont une fonction alcool primaire au C_{21} et une fonction cétone au C_{20}. Ce sont les stéroïdes du groupe de la corticostérone dont certains ont un oxydrile en 17 α.

Les dérivés naturels de l'œstrane ont un cycle A aromatique. Ce sont des dérivés de l'œstra 1, 3, 5, (10) triène. Le noyau A benzénique a ses six atomes de carbone situés dans un même plan aux sommets d'un hexagone régulier. Les groupements monovalents substitués à un H du noyau A, oxydrile par exemple, seront orientés dans une seule direction contenue dans le plan du noyau.

Il est à prévoir que le comportement des sulfatases sera différent suivant qu'il s'agira d'un ester-sulfate de phénol, d'un ester-sulfate en 3 α ou 3 β, d'un stéroïde de configuration 5 α ou 5 β ou enfin d'un ester-sulfate en 17 ou en 21.

C'est pour cette raison que nous exposerons les résultats obtenus au cours de l'action des sulfatases sur les esters-sulfates, en traitant d'abord des arylsulfates et des esters-sulfates des dérivés de l'œstrane,

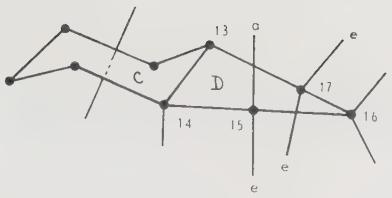


FIGURE 44 : Cycle cyclopentanique accolé à un cycle cyclohexanique (trans-hydrindane). a) Liaison axiale. e) Liaison équatoriale

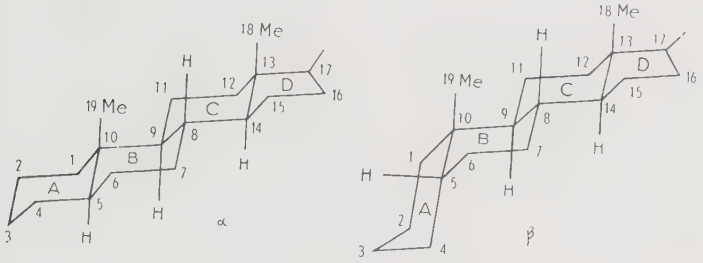


FIGURE 45 : Structure de l'androstane :
5 α-androstane (A/B trans, B/C trans, C/D trans);
5 β-androstane (A/B cis, B/C trans, C/D trans)

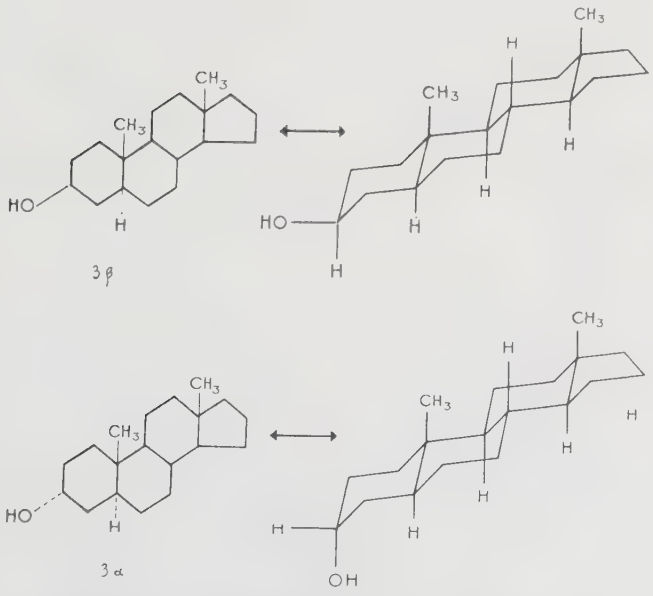


FIGURE 46 : Représentation du 5 α-androstane 3-ol
3 β : isomère équatorial ; 3 α : isomère axial

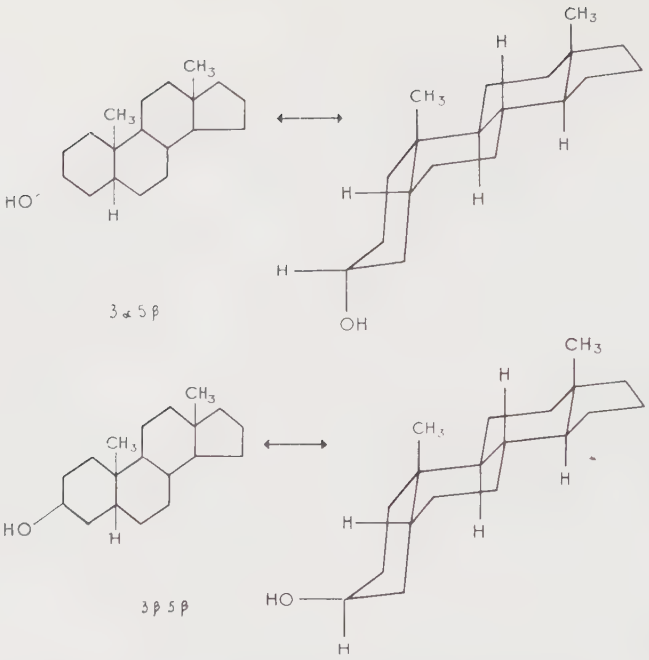


FIGURE 46 *bis* : Représentation du 5 β-androstane 3-ol
3 α : isomère équatorial ; 3 β : isomère axial

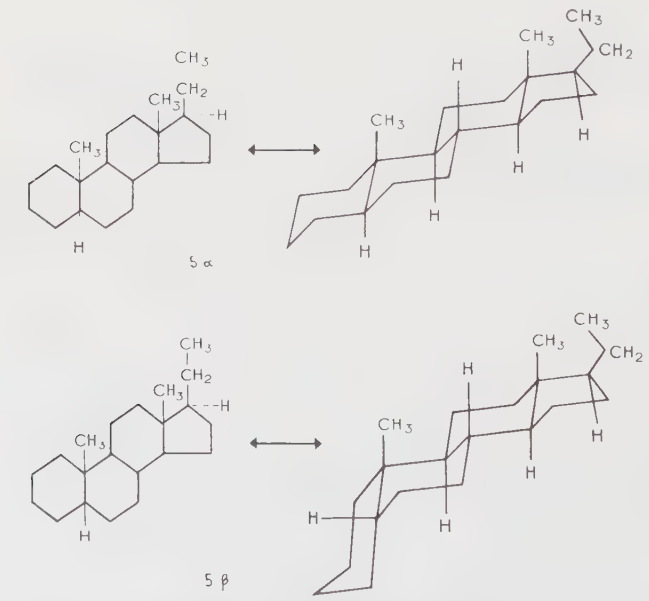


FIGURE 47 : Représentation du pregnane par une formule plane :
5 α : *en haut* ; 5 β : *en bas*

puis des dérivés de l'androstane et enfin des esters-sulfates des dérivés du prégnane, les esters-sulfates en 21 du groupe de la corticostérone étant considérés à part.

Les esters-sulfates de stéroïdes dérivés du prégnane ont été préparés par Zelnik, Desfosses et Emiliozzi [121], les esters-sulfates du groupe de la corticostérone par Pasqualini, Zelnik et Jayle [77], les esters-sulfates de la série de l'androstane par Emiliozzi [39].

SPECIFICITE DES SULFATASES DU SHP

Dès le début de l'emploi du SHP comme agent d'hydrolyse des stéroïdes conjugués urinaires, la question de la spécificité de l'action sulfatasique s'est posée. La plupart des stéroïdes-sulfates étaient hydrolysés, cependant certains l'étaient peu (sulfate de 5 β-androstane 3 α-yl 17-one et sulfate de 5 β-androstane 3 β-yl 17-one), d'autres ne l'étaient pas du tout (sulfate de 5 α-androstane 3 α-yl 17-one) (Henry et Jarrige [54], Henry et Thévenet [53]).

Roy [87], le premier, a étudié la spécificité de l'action hydrolysante d'une préparation purifiée de sulfatases de *Patella*. Pour marquer cette spécificité, il a proposé de donner à l'enzyme le nom de « stéroïde-sulfatase » puis de « 3 β stéroïde-sulfatase ».

L'absence d'hydrolyse du sulfate de 5 α-androstane 3 α-yl 17-one et la lente hydrolyse des sulfates de 5 α-androstane 3 α et 3 β-yl 17-one par le SHP brut ont été confirmées par Bloch et Gibree [8] ; par Ammon et Ney [3] ; par Leon, Bulbrook et Corner [60].

Nous avons étudié la spécificité des fractions actives obtenues après fractionnement acétono-éthanolique du SHP.

L'hydrolyse est effectuée au thermostat à + 37°5 pendant une heure en mettant en présence :

— Stéroïde-sulfate 0,3 mM ..... 0,3 ml
— Tampon acéto-acétique 0,5 M, pH 4,5 .... 0,1 ml
— Enzyme ..... 0,1 ml

L'ester-sulfate non hydrolysé est déterminé par la méthode de Vlitos (p. 31). La préparation enzymatique utilisée, diluée au 1/10, correspond à la teneur en protéine employée par Roy [87].

Les résultats sont exprimés en pour cent d'hydrolyse de la quantité d'ester-sulfate soumis à l'action enzymatique.

Les résultats du *Tableau X* confirment la spécificité de la stéroïde-sulfatase vis-à-vis des esters-sulfates de

— 5 α-pregnane 3 β-yl 20-one
— pregna 5-ène 3 β-yl 20-one
— 5 α-androstane 3 β-yl 17-one
— androsta 5-ène 3 β-yl 17-one

TABLEAU X

SUBSTRAT Sulfate de Sodium et de	HYDROLYSE par la stéroïde-sulfatase de PATELLA (HOY (87))		FRACTION acétone-éthanolique du S.H.P.	
	1 heure	17 heures	enzyme 1/10 1 heure	enzyme non dilué 1 heure
oestrone			56 %	
oestriol 3-sulfate			27 %	
oestradiol 3,17-disulfate			0	
androstérone sulfate ou de 5α-androstane 3α-yl 17-one	0	1 %	0	0
epiandrostérone ou de 5α-androstane 3β-yl 17-one	26 %	96 %	48 %	-
déhydro-epiandrostérone ou androsta 5-ène 3β-yl 17-one	59 %	96 %	67 %	-
5β-androstane 3α-yl 17-one	2 %	0	5,7 %	-
5β-androstane 3β-yl 17-one	0	1 %	4 %	
5α-androstane 17β-yl 3-one	-	-	-	0
testostérone ou d'androsta 4-ène 17β-yl 3-one +				
5α-prégnane 3α-yl 20-one	0	-	0	0
5α-prégnane 3β-yl 20-one	9 %	78 %	66 %	
pregna 5-ène 3β-yl 20-one	56 %	94 %	57 %	
5β-prégnane 3α-yl 20-one	2 %	-	2,3 %	23 %
5β-prégnane 3β-yl 20-one	0	1 %	0	1 %
cortisone 21-sulfate	2 %	33 %	enzyme 1/20 99 %	
desoxycorticostérone 21-sulfate	-	-	99 %	
Substance S ou de pregna 4-ène 21-yl 17α-ol 3,20 dione	-	-	99 %	

+ - sel de potassium

Contrairement à la préparation de sulfatases de *Patella*, la fraction active du SHP hydrolyse le sulfate de 5 β-androstane 3 α-yl 17-one et le sulfate de 5 β-androstane 3 β-yl 17-one.

Les sulfatases du SHP comme celles de *Patella*, n'hydrolysent pas les esters-sulfates en 17.

Il faut noter l'activité hydrolysante de la fraction acétono-éthanolique de SHP vis-à-vis des esters-sulfates des dérivés de la corticostérone.

L'étude de la cinétique de l'hydrolyse de ces différents substrats va nous permettre de déterminer l'affinité de ces enzymes et d'aborder l'étude de leur mode d'action.

B. — ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE DES ESTERS-SULFATES

L'étude de la spécificité des sulfatases purifiées du SHP, vis-à-vis des différents stéroïdes-sulfates, montre l'importance de la configuration moléculaire. Des stéroïdes-sulfates dont les noyaux A et B sont en position « trans » et le carbone 5 porteur d'un H en α ou impliqué dans une double liaison, seuls sont hydrolysés les esters-sulfates d'une fonction alcool en 3 β, c'est-à-dire équatoriale par rapport au noyau A.

Les esters-sulfates d'une fonction alcool en 3 β (axiale) ou 3 α (équatoriale) de stéroïdes dont les noyaux A et B sont en position « cis » et le carbone 5 porteur d'un H en β sont hydrolysés mais l'ester-sulfate en 3 α est plus facilement hydrolysé que l'ester-sulfate en 3 β. Les esters-sulfates d'une fonction alcool en 17 β ne sont pas hydrolysés.

Nous allons exposer les résultats obtenus au cours de l'étude cinétique de l'hydrolyse des stéroïdes-sulfates. Nous donnerons seulement quelques résultats relatifs à l'hydrolyse d'arylsulfates.

I. — MATERIEL ET METHODES

1° *Matériel*

La fraction active obtenue après traitement du SHP par l'acétone et par l'éthanol a été utilisée.

Les esters-sulfates employés étaient ceux précédemment décrits, sels de sodium, de potassium ou de pyridine du sulfate de stéroïde.

Le cation n'entraîne pas de modification de l'hydrolyse enzymatique.

2° *Techniques expérimentales*

Nous disposons de deux méthodes pour suivre la réaction d'hydrolyse :

a) méthode au bleu de méthylène de VLITOS appliquée par ROY [87] au dosage du stéroïde-sulfate non hydrolysé ;

b) titrage par la méthode potentiométrique continue à pH constant des ions SO_4^{2-} libérés par hydrolyse.

a) DOSAGE DU STÉROÏDE-SULFATE PAR LA MÉTHODE DE VLITOS

Le principe et la technique ont été exposés précédemment.

L'hydrolyse des esters-sulfates est faite au thermostat en présence de tampon acéto-acétique au pH optimum de l'enzyme et à la concentration finale de 0,125 M. Le milieu est additionné de chlorure de potassium à la concentration finale 0,01 M, afin d'être dans les mêmes conditions de concentration en ions Cl^- que dans la méthode potentiométrique. On opère avec une concentration de substrat identique à celle utilisée dans la méthode potentiométrique.

Le volume total du mélange est de 10 ml. L'enzyme est introduit au temps zéro, après équilibre des températures de l'enzyme d'une part et du mélange substrat et tampon d'autre part. Le liquide est agité par un barreau magnétique durant l'hydrolyse.

A des intervalles de deux minutes on prélève à l'aide d'une pipette à striction 0,1 ml du mélange que l'on introduit aussitôt dans 6 ml d'éthanol absolu refroidi à 0° ; après centrifugation, 5 ml sont évaporés au bain-marie bouillant et le résidu repris par :

— Réactif au bleu de méthylène ..... 1 ml

On ajoute :

— Chloroforme ..... 2 ml

et on procède à l'extraction comme il a été dit au *Chapitre I* (p. 31).

b) TITRAGE PAR LA MÉTHODE POTENTIOMÉTRIQUE CONTINUE A pH CONSTANT

C'est la méthode utilisée pour suivre l'action des estérases par STEDMAN [104], ainsi que pour suivre la coupure des liaisons peptidiques d'un polypeptide par WALEY et WATSON [114]. Elle consiste à titrer par la soude l'ion acide libéré par l'action enzymatique.

L'acide sulfurique est un acide fort dont les constantes de dissociation $1{,}20 \cdot 10^{-2}$ (pK = 1,92) pour la première acidité, $1{,}54 \cdot 10^{-2}$ (pK = 1,81) pour la seconde, donnent l'assurance que la méthode potentiométrique est applicable dans les conditions de pH utilisées.

Nous avons repris le dispositif expérimental décrit par Waley et Watson et utilisé le pHmètre Tacussel TS 4 à gamme étalée permettant des lectures de 0,02 unité pH.

La solution étudiée (10 ml) est contenue dans un récipient cylindrique dont le bouchon rodé comporte les orifices par lesquels passent les deux électrodes du pHmètre, les conduits capillaires de deux microseringues Agla, l'une à acide chlorhydrique 1 N, l'autre à soude 0,1 N, et l'arrivée et le départ d'un courant d'azote préalablement humidifié et réchauffé à la température du thermostat par barbotage dans un flacon laveur plongeant dans le thermostat. Cet ensemble, solidaire d'un support mobile maintenant le bouchon rodé, plonge dans un récipient cylindrique en Afcodur où circule l'eau pulsée par la pompe du thermostat.

Un thermomètre au 1/100 de degré plonge dans l'eau et permet le contrôle précis de la température. Le récipient en matière plastique repose sur un agitateur magnétique permettant le mélange permanent des liquides dans l'enceinte où plongent les électrodes.

La solution de stéroïde-sulfate en milieu 0,01 M en chlorure de potassium est d'abord introduite. Quand l'équilibre des températures est atteint, on ajuste au pH fixé, on vérifie la stabilité du pH pendant cinq minutes et on ajoute, au temps t_0, à l'aide d'une pipette à striction, la préparation enzymatique préalablement portée à la même température et au pH fixé. On ajoute 1/2 ou 1 mm^3 de soude 0,1 N qui entraîne un décalage de 0,03 à 0,05 unité pH. A l'aide d'un chronomètre à trotteuse rattrapante, on note le moment précis où l'aiguille du pHmètre reprend sa position de départ, et ainsi de suite pendant quinze minutes ou davantage suivant les besoins. On a, durant les premières minutes, un pointé toutes les dix ou vingt secondes. La quantité de soude 0,1 N, finalement ajoutée, est négligeable par rapport au volume du liquide de la réaction d'hydrolyse. Le tracé obtenu, en portant les quantités de soude 0,1 N ajoutées en fonction du temps, permet de calculer la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse. On l'exprime en mm^3, 10^{-3} de NaOH 0,1 N par seconde.

Ammon et Ney [3] ont comparé l'estimation manométrique et électrotitrimétrique des sulfatases. Ils les ont appliquées au SHP, à l'*Aspergillus orizoe* et à la stéroïde-sulfatase de foie. Ces méthodes, disent les auteurs, sont avantageuses dans les milieux colorés, mais sont 100 à 200 fois moins sensibles que la méthode spectrophotométrique.

Ils utilisent la méthode électrotitrimétrique à + 37°, en récipient thermostaté contenant :

— DHAS 0,1 M	0,5 ml
— Eau	4 ml
— SHP	0,3 ml

L'électrode du pHmètre plonge dans le liquide. A l'aide d'une microburette graduée en centièmes de ml, de la soude 0,01 N est versée toutes les cinq minutes pour compenser la chute du pH. L'expérience est prolongée trente minutes. La quantité de substrat hydrolysé est calculée d'après le volume de soude versée.

La conclusion des auteurs est sans doute liée au mode opératoire employé et au fait qu'ils utilisent, au moins dans deux cas, des préparations non purifiées. La quantité d'SHP employée représente de 6 à 8 mg d'azote protéique et l'effet tampon des protéines peut ne pas être négligeable.

La méthode potentiométrique à pH constant permet la détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse des stéroïdes-sulfates avec une précision et une reproductivité satisfaisante. Le coefficient de variation calculé pour n = 10 déterminations de v_0 dont la moyenne :

$$\bar{x} = 56{,}7 \text{ mm}^3 \cdot 10^{-3} \text{ de soude 0,1 N} \cdot \text{sec}^{-1}$$

est de ± 6,2 % pour un seuil de probabilité de 95 %.

La méthode de Vlitos est moins précise et il est difficile d'avoir autant de données expérimentales dans les deux ou trois premières minutes d'hydrolyse, limite de la période durant laquelle la vitesse est constante (*fig. 48* et *49*).

Nous n'avons pas utilisé la méthode manométrique, le pH optimum acide des stéroïdes-sulfatases d'SHP étant incompatible avec un milieu bicarbonaté.

La méthode de dosage des ions sulfate par néphélométrie du précipité obtenu par le chlorure de baryum est inutilisable, vu la dispersion des résultats pour les faibles concentrations en SO_4^{2-}, comme c'est le cas au début de l'hydrolyse.

II. — ETUDE CINETIQUE DE LA REACTION D'HYDROLYSE DES ESTERS-SULFATES

REACTIONS ENZYMATIQUES EN L'ABSENCE D'INHIBITEUR

Une réaction enzymatique comporte deux processus essentiels : la formation réversible d'un complexe entre l'enzyme et le substrat, et la dissociation irréversible de ce complexe, pour donner naissance aux produits de la réaction suivant le schéma :

$$E + S \underset{k'_1}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_s} E + P$$

E étant l'enzyme, S le substrat, ES le complexe intermédiaire et P les produits de la réaction, k_1, k'_1 et k_s des constantes spécifiques de vitesse dans le sens indiqué par les flèches.

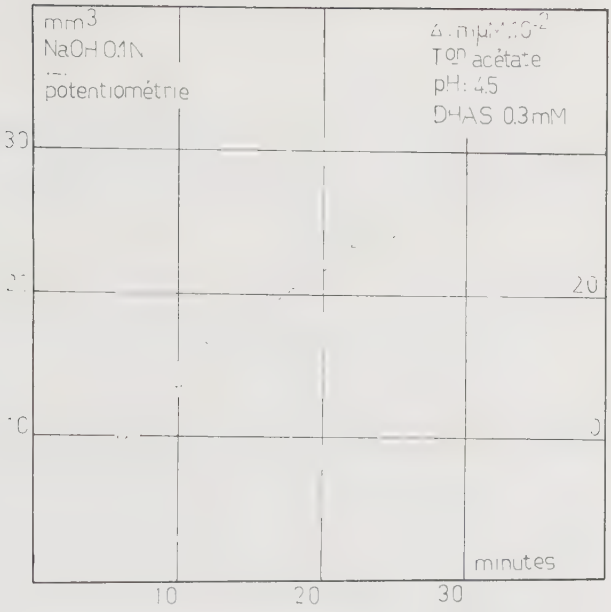


FIGURE 48 : Hydrolyse enzymatique du sulfate de déhydroépiandrostérone, suivie par potentiométrie continue à pH constant (. — .) et par dosage indirect du stéroïde libéré par la méthode de Vlitos (Δ)

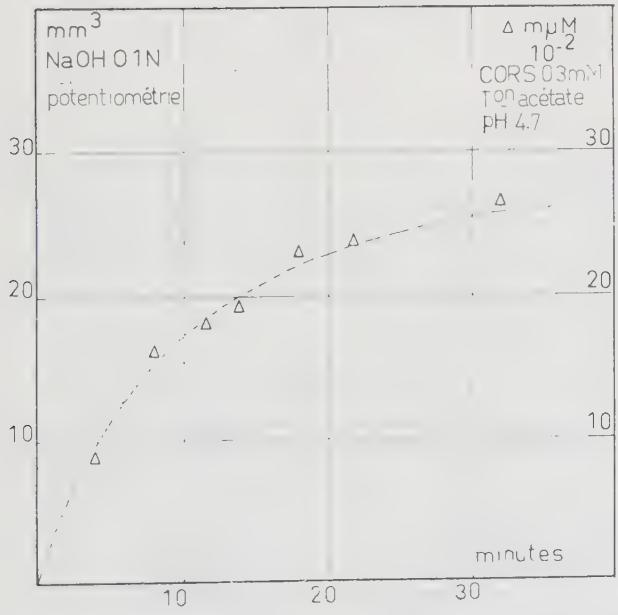


FIGURE 49 : Hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate, suivie par potentiométrie continue à pH constant (. — .) et par dosage indirect du stéroïde libéré par la méthode de Vlitos (Δ)

C'est la loi quantitative de la cinétique enzymatique formulée par V. HENRI, puis par MICHAELIS et MENTEN.

On obtient une équation des vitesses de la forme :

$$v = \frac{Km + s}{k_s \, e \, s}$$

dans laquelle e, s représentent respectivement les concentrations totales de l'enzyme et du substrat ; Km est la constante de Michaelis du système, elle est égale à $(k'_1 + k_s) / k_1$.

Une réaction enzymatique est pratiquement définie, si l'on peut connaître d'une part Km qui, lorsque k_s est négligeable devant k'_1, représente la constante de dissociation du complexe (soit donc l'inverse de la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat), d'autre part la constante de vitesse k_s. Cette dernière valeur se calcule à partir de la vitesse maximum Vm. En effet, on atteint la vitesse maximum lorsque toute l'enzyme est sous forme de complexe E S, ce qui s'exprime par :

$$Vm = k_s e$$

L'équation des vitesses peut alors se mettre sous la forme :

$$v = \frac{Vm \; s}{Km + s}$$

Plusieurs procédés sont employés pour la détermination des constantes, celui de EADIE [34] est adopté ici, l'équation des vitesses est mise sous la forme :

$$v = Vm - Km \; v/s$$

En portant v en fonction de v/s, on obtient une droite de pente — Km et dont l'intersection avec l'axe des ordonnées donne Vm.

Avant d'aborder l'étude des constantes Km et k_s, il est nécessaire d'établir comment varie la vitesse en fonction de la concentration du substrat et de la concentration de l'enzyme.

C'est ce que nous avons fait pour chacun des substrats utilisés.

REACTIONS ENZYMATIQUES EN PRESENCE D'UN INHIBITEUR

Nous avons retenu le mode de représentation de EADIE pour l'étude des inhibitions.

1) *Inhibition compétitive :*

L'inhibiteur (I) se fixe sur l'enzyme en un même lieu que le substrat :

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$
$$E + I \rightleftharpoons EI$$

L'équation des vitesses est de la forme :

$$v = \frac{k_s\ e\ s}{Km\left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right) + s}$$

2) *Inhibition non compétitive :*

L'inhibiteur se fixe sur l'enzyme en un site différent du lieu de fixation du substrat :

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$
$$E + I \rightleftharpoons EI$$
$$ES + I \rightleftharpoons ESI$$

$$v = \frac{k_s\ e\ s}{Km + s} \cdot \frac{1}{1 + (I)/K_i}$$

3) *Inhibition par blocage du complexe intermédiaire :*

L'inhibiteur se fixe à la fois sur l'enzyme et sur le substrat et forme un complexe ternaire inactif.

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$
$$ES + I \rightleftharpoons ESI$$

L'équation des vitesses est de la forme :

$$v = \frac{k_s\ e\ s}{\frac{Km}{1 + \frac{(I)}{K_i}} + s} \cdot \frac{1}{1 + \frac{(I)}{K_i}}$$

Lorsque l'inhibition peut être assimilée à l'un des trois types simples décrits, l'étude des variations des constantes V'_m et K'_m en fonction de la concentration de l'inhibiteur (I) permet de distinguer la forme d'inhibition impliquée dans la réaction. La pente des droites obtenues donne directement la constante de MICHAELIS expérimentale (— K'_m) et l'intersection avec l'axe des ordonnées donnant la vitesse maximum (V'_m). K_m et V_m représentent ces valeurs en l'absence d'inhibiteur.

Si (I) représente la concentration en inhibiteur, K_i la constante d'inhibition, q le facteur $(1 + I/K_i)$, on peut résumer avec J. YON [120] les résultats obtenus suivant le type d'inhibition, ainsi :

Inhibition	*Pente : K'm*	*Intersection : V'm*
Compétitive	$K'_m = K_m \cdot q$	$V'_m = V_m$
Non compétitive	$K'_m = K_m$	$V'_m = V_m/q$
Blocage de ES	$K'_m = K_m/q$	$V'_m = V_m/q$

On peut déterminer K_i à partir de la droite obtenue en portant v/v_i, où v est la vitesse initiale en l'absence d'inhibiteur, v_i la vitesse initiale en présence d'inhibiteur, en fonction de la concentration en inhibiteur.

Quand il s'agit d'une inhibition non compétitive, la droite est la même quelle que soit la concentration en substrat, la pente est égale à $1/K_i$.

Quand il s'agit d'une inhibition compétitive, les pentes des droites augmentent en fonction de l'inverse de la concentration du substrat. Ces pentes représentent :

$$\frac{K_m}{K_i}\left(1 + \frac{1}{K_m}_{s}\right)$$

1° *ARYLSULFATES*

a) Nitrocatéchol-sulfate (NCS)

L'hydrolyse du NCS ne se prête pas au titrage par potentiométrie continue à pH constant étant donné le pouvoir tampon de la fonction phénol libre au pH où l'on opère. Andersen [1] l'a réalisée à pH 5,0 pour étudier l'arylsulfatase A de foie de bœuf. Nous avons vu au *chapitre I* (p. 23) que le pH optimum d'hydrolyse en milieu tampon tris-maléique est 7,2 la concentration saturante du substrat : 15 mM. Quand on réalise l'hydrolyse dans ces conditions, la vitesse de la réaction est linéaire durant les quinze premières minutes et est fonction de la concentration en enzyme dans un large intervalle de concentrations, c'est pourquoi nous avons déterminé K_m à pH 7,2 en dosant le nitrocatéchol libéré en quinze minutes par le réactif au quinol de Roy. les concentrations en NCS étant comprises entre 0,33 mM et 16,5 mM. La *figure 50* permet de calculer les valeurs suivantes :

$K_m = 0{,}45 \cdot 10^{-3}$ M
$V_m = 27{,}7$ µg/15 min, soit 11,8 mµ M . min^{-1}
$k_s = 84 \cdot 10^3$ mµ M . min^{-1} par mg N
e = 0,14 µg N

L'action de l'ion Cl^- sur l'hydrolyse du NCS se manifeste par une inhibition de :

— 13 % pour une concentration 0,25 M
— 26 % — — 0,50 M
— 37 % — — 1 M

b) Phénolphtaléine-sulfate (PPS)

L'hydrolyse de ce substrat se prête au titrage par potentiométrie continue à pH constant. Le pH optimum d'hydrolyse est 5,5, la con-

centration saturante du substrat : 1,5 mM, mais des concentrations supérieures entraînent une inhibition de l'hydrolyse. La vitesse d'hydrolyse est fonction de la concentration en enzyme dans un intervalle étroit de concentrations. Dans ces limites, la constante de MICHAELIS calculée d'après les données obtenues à + 37° est :

$K_m = 0{,}15 \cdot 10^{-3}$ M
$V_m = 63{,}2$ mm³ NaOH 0,1 N 10^{-3} sec^{-1}
$k_s = 47 \cdot 10^2$ mμ M . min^{-1} par mg N
e = 80 μg N

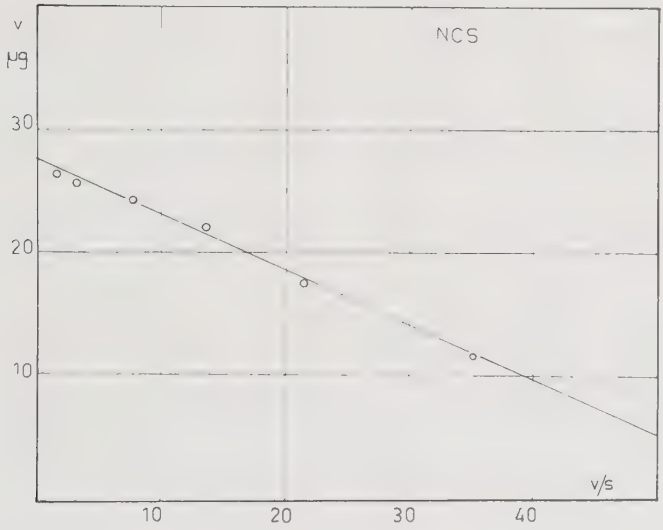


FIGURE 50 : Hydrolyse enzymatique du nitrocatéchol-sulfate. Représentation suivant EADIE.

En ordonnées : vitesses initiales d'hydrolyse
En abscisses : vitesses initiales que divise la concentration correspondante du substrat (v/s)

c) ŒSTRONE-SULFATE

Le pH optimum d'hydrolyse de l'œstrone-sulfate en solution dans le tampon triéthanolamine - ac. acétique (Schering, Berlin) est 5,2. La concentration saturante du substrat 0,5 mM. La vitesse d'hydrolyse est fonction de la concentration en enzyme dans un faible intervalle de concentrations. Dans ces limites, nous avons trouvé :

$K_m = 0{,}11 \cdot 10^{-3}$ M

2° *STEROIDES-SULFATES*

Nous étudierons l'hydrolyse des esters-sulfates dérivés de :

A) l'androstane ;

B) du prégnane ;

C) de la corticostérone.

Nous indiquerons, pour les plus importants d'entre eux, l'effet de certains ions ou d'autres stéroïdes-sulfates sur leur hydrolyse.

A) DERIVES DE L'ANDROSTANE

Nous avons vu que seuls étaient hydrolysés les sulfates de 5 α-androstane et androsta 5-ène 3 β-yl 17-one et les sulfates de 5 β-androstane 3 α-yl ou 3 β-yl 17-one.

Nous exposerons d'abord les résultats obtenus au cours de l'hydrolyse :

— du sulfate de 5 α-androstane 3 β-yl 17-one (sulfate d'épiandrostérone) ;

— du sulfate d'androsta 5-ène 3 β-yl 17-one (déhydroépiandrostérone sulfate, DHAS) ;

en précisant l'action, sur l'hydrolyse du DHAS, des stéroïdes-sulfates non hydrolysables.

Nous verrons ensuite les résultats obtenus au cours de l'hydrolyse :

— du sulfate de 5 β-androstane 3 α-yl 17-one (sulfate d'α-étiocholanolone) ;

— et du sulfate de 5 β-androstane 3 β-yl 17-one (sulfate de β-étiocholanolone).

1) Sulfate d'épiandrostérone

Le pH optimum d'hydrolyse est 4,5-5. Il n'y a pas de différence significative entre les vitesses initiales d'hydrolyse à ces deux pH.

Les données expérimentales représentées sur la *figure 51* permettent de calculer :

$K_m = 0{,}032 \cdot 10^{-3}$ M
$V_m = 21{,}2$ mm^3 . 10^{-3} NaOH 0,1 N . sec^{-1}
$k_s = 58{,}2$ mμ M . min^{-1}/mg N
e $= 2{,}18$ mg N

2) Sulfate de déhydroépiandrostérone

Le pH optimum d'hydrolyse est 4,5-5. Il n'y a pas de différence significative entre les vitesses initiales d'hydrolyse à ces deux pH.

La concentration saturante du substrat est 0,6 mM.

La courbe d'hydrolyse du substrat déterminée par la méthode de Vlitos est superposable à celle obtenue par titrage potentiométrique à pH constant (*fig. 48*).

La courbe d'hydrolyse totale du substrat (*fig. 52*) montre qu'une nouvelle addition d'enzyme au bout de quatre-vingts minutes n'entraîne pas d'hydrolyse supplémentaire.

Les vitesses initiales sont proportionnelles à la concentration en enzyme (*fig. 53*) dans la zone de concentrations où nous avons travaillé.

La constante de MICHAELIS est égale à :

$K_m = 0{,}028 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,01

La valeur de $k_s = 45$ mμ M . min^{-1}/mg N $\pm$ 3

Les stéroïdes-sulfates en 17 β-yl n'étant pas hydrolysés, on s'est demandé si la présence d'une fonction cétone en 17 était indispensable à la fixation du substrat par l'enzyme.

La présence d'un oxydrile libre en 17 n'entraîne pas de modification importante de l'affinité ; ainsi, pour le sulfate de 3 β-yl 17-hydroxy androsta 5-ène dont le pH optimum d'hydrolyse est 4,5-5 :

$K_m = 0{,}067 \cdot 10^{-3}$ M

— *Action de l'ion Cl^- :* La vitesse d'hydrolyse du DHAS ne varie pas en milieu KCl de 0,003 M à 0,01 M ; au delà, une inhibition non compétitive apparaît. La présence de l'ion Cl^- n'affecte pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat (*fig. 54*). La valeur de K_i déterminée par la pente de v_o/v_i en fonction de la concentration en inhibiteur est :

$K_i = 1$ M $\pm$ 0,2

— *Action de l'ion SO_4^{2-}* : L'ion SO_4^{2-} a une action inhibitrice sur la vitesse initiale d'hydrolyse du DHAS. Jusqu'à la concentration 1 mM, l'inhibition est non compétitive et :

$K_i = 0{,}4 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,05 (*fig. 55*)

— *Action de l'ion PO_4^{3-}* : L'ion PO_4^{3-} à une action inhibitrice. Comme pour l'ion SO_4^{2-} jusqu'à la concentration 1 mM, l'inhibition est non compétitive :

$K_i = 0{,}8 \cdot 10^{-4}$ M $\pm$ 0,1 (*fig. 55*)

Au delà de cette concentration, les pentes des droites v_o en fonction de v/s augmentent nettement, mais les V'_m varient et ne permettent pas de conclure à une inhibition compétitive. Le même fait se produit sous l'action de l'ion SO_4^{2-}. Ici, on peut penser que l'effet tampon intervient et entraîne cette imprécision.

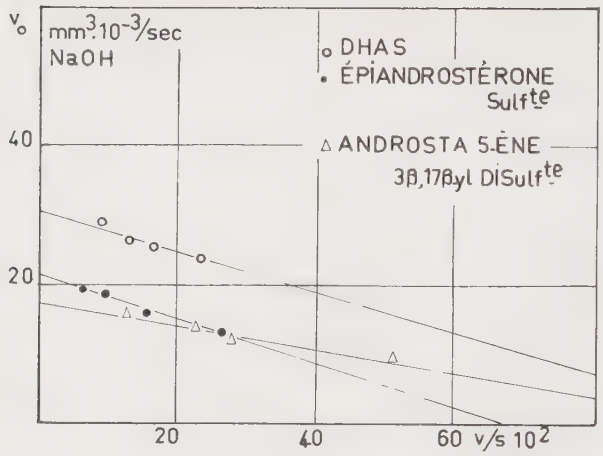


FIG. 51 : Hydrolyse enzymatique du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHAS), du sulfate d'épiandrostérone et du disulfate d'androsta 5-ène 3 β, 17 β-yl. Représentation suivant EADIE

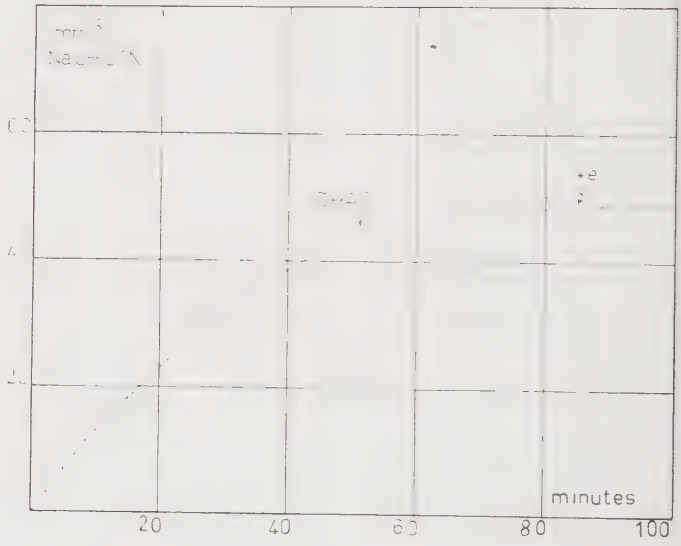


FIG. 52 : Hydrolyse enzymatique totale du sulfate de déhydroépiandrostérone. Addition d'une nouvelle quantité d'enzyme (+ e), au milieu d'incubation, quand la vitesse d'hydrolyse tend vers zéro et contrôle de l'absence d'hydrolyse après cette addition

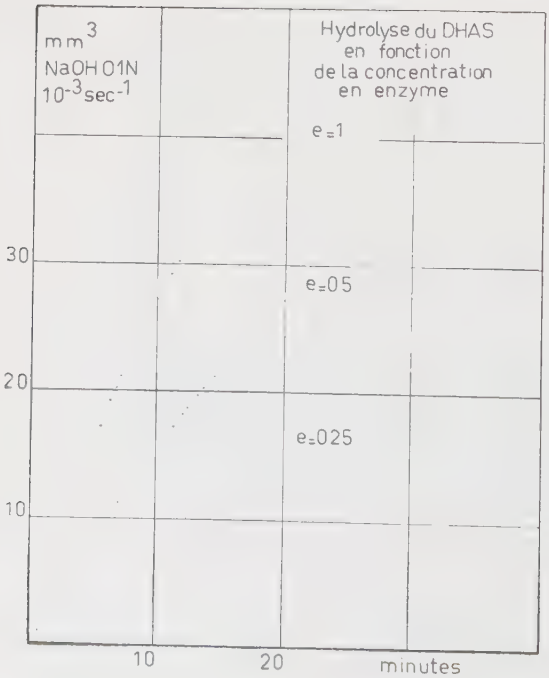


FIG. 53 : Vitesse initiale d'hydrolyse du sulfate de déhydroépiandrostérone en fonction de la concentration de l'enzyme

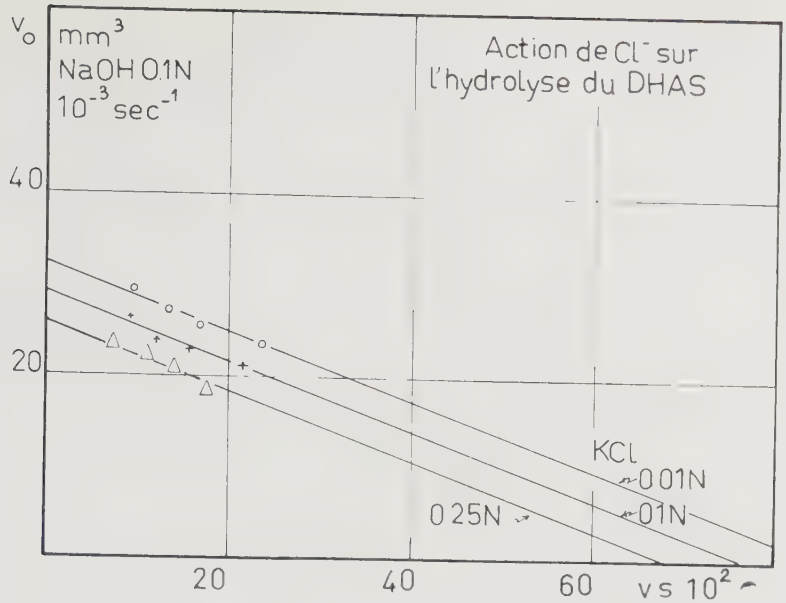


FIGURE 54 : Action de l'ion Cl^- sur l'hydrolyse enzymatique du sulfate de déhydroépiandrostérone

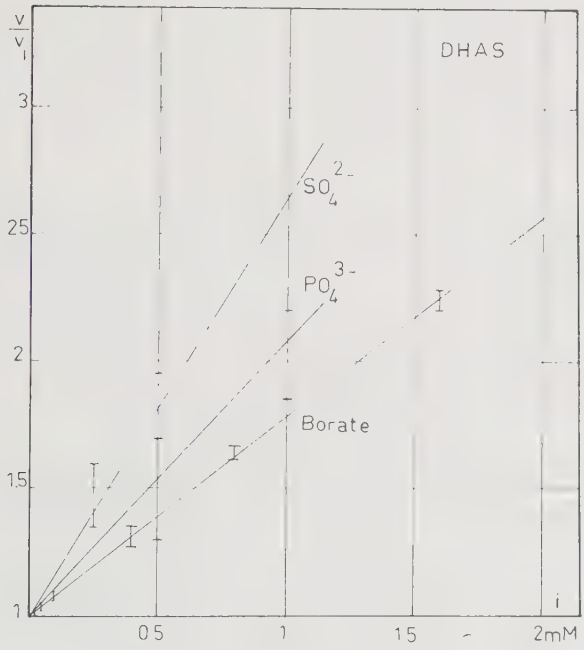


FIGURE 55 : Action inhibitrice des ions sulfate, phosphate, borate sur l'hydrolyse du sulfate de déhydroépiandrostérone

En ordonnées : Le rapport des vitesses initiales sans inhibiteur et en présence d'inhibiteur

En abscisses : la concentration en inhibiteur

Les tirets indiquent la dispersion des résultats

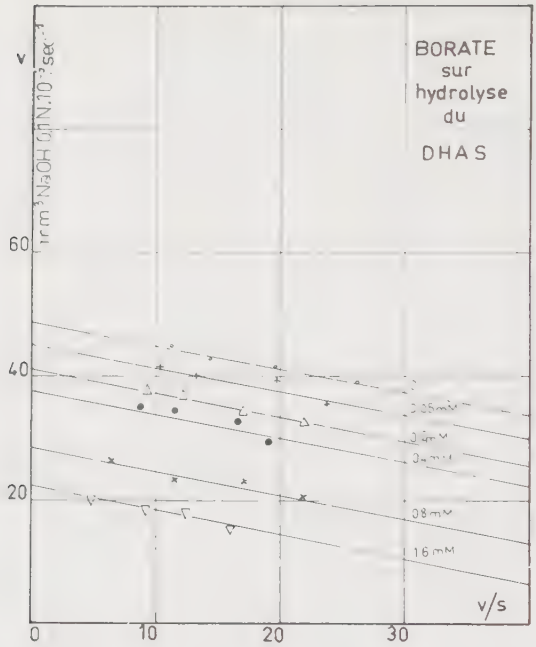


FIGURE 56 : Inhibition de la stéroïde-sulfatase par l'ion borate.
Représentation suivant EADIE

En ordonnées : les vitesses initiales
En abscisses : le rapport des vitesses initiales aux concentrations du substrat
Hydrolyse en absence de borate : 0
Hydrolyse en présence des concentrations : 0,05, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 mM de borate

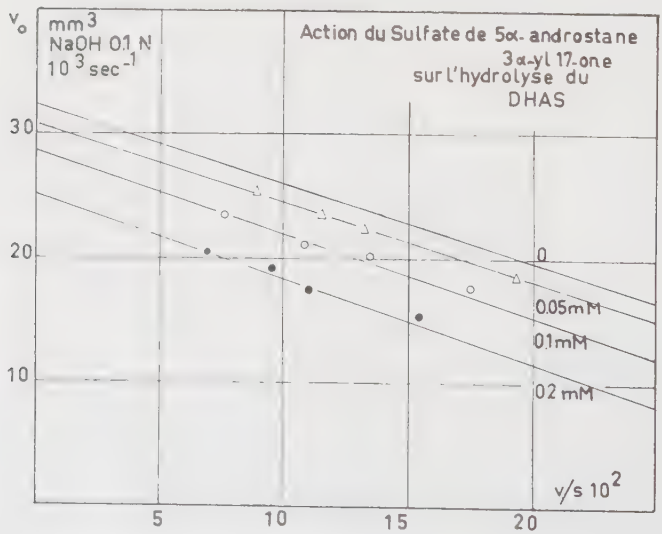


FIGURE 57 : Inhibition de la stéroïde-sulfatase par le sulfate de 5 α-androsta 3 α-yl 17-one

— *Action de l'ion borate :* L'ion borate a une action inhibitrice du type non compétitif (*fig. 56*) :

$K_i = 1{,}26 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,07

— *Action des stéroïdes-sulfates non hydrolysables :*

a) *Sulfate de 5 α-androstane 3 α-yl 17-one :* inhibition non compétitive (*fig. 57*) :

$K_i = 0{,}50 \cdot 10^{-4}$ M $\pm$ 0,1

b) *Sulfate d'androsta 4-ène 17 β-yl 3-one* (*sulfate de testostérone*) : l'inhibition est compétitive (*fig. 58*) :

$K_i = 0{,}018 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,005

c) *Sulfate de 5 α-androstane 17 β-yl 3-one :* l'inhibition est compétitive (*fig. 59*) :

$K_i = 0{,}049 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,03

Ces deux stéroïdes-sulfates non hydrolysables se fixent sur l'enzyme au même point que le substrat.

— *Cas particulier du disulfate d'androsta 5-ène 3 β, 17 β-yl :* Etant donné l'absence d'hydrolyse des stéroïdes-sulfates en 17, on pouvait se demander si un disulfate en 3 et en 17 serait hydrolysé. Le disulfate d'androsta 5-ène 3 β, 17 β-yl est hydrolysé, son hydrolyse est plus lente que celle du DHAS.

La constante de Michaelis :

$K_m = 0{,}017 \cdot 10^{-3}$ M (*fig. 51*)

$k_s = 23$ mμ M . min^{-1}/mg N sensiblement la moitié de k_s pour DHAS

Ceci semble normal ; c'est le sulfate en 3 β qui est hydrolysé, le sulfate en 17 se comportant comme inhibiteur. En effet, sa présence dans le milieu d'hydrolyse du DHAS entraîne une inhibition compétitive (*fig. 60*) :

$K_i = 0{,}066 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,004

3) Sulfates d'étiocholanolone

a) *Sulfate de 5 β-androstane 3 α-yl 17-one* (sulfate d'étiocholanolone).

b) *Sulfate de 5 β-androstane 3 β-yl 17-one* (sulfate de β-étiocholanolone).

Ces esters-sulfates sont hydrolysés.

L'hydrolyse est lente et ne peut être suivie par potentiométrie. Elle est étudiée en tampon acéto-acétique par prélèvements, à des intervalles d'une heure, d'une partie aliquote du mélange enzyme substrat maintenu au thermostat à 37°5 et dosage du stéroïde-sulfate

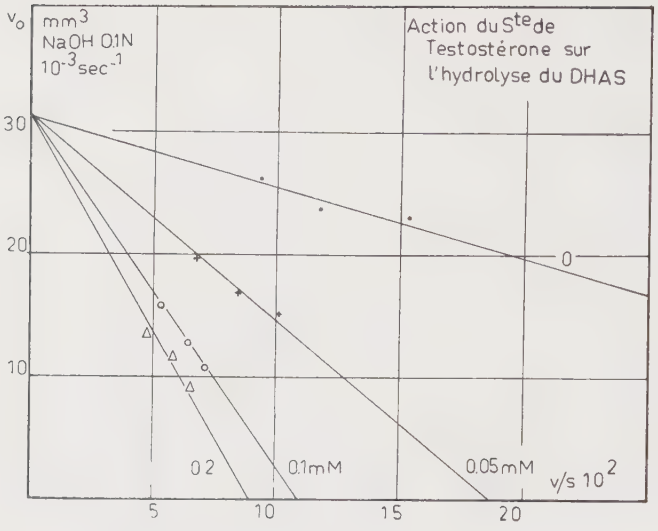


FIG. 58 : Inhibition de la stéroïde-sulfatase par le sulfate de testostérone

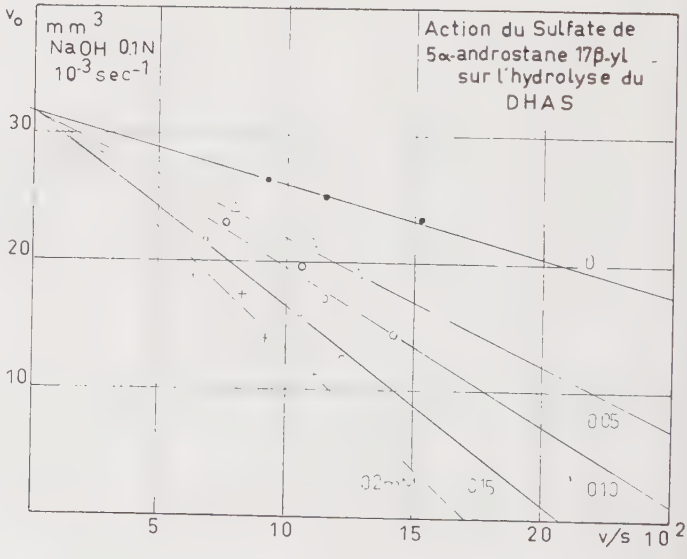


FIG. 59 : Inhibition de la stéroïde-sulfatase par le sulfate de 5 α-androsta 17 β-yl 3-one

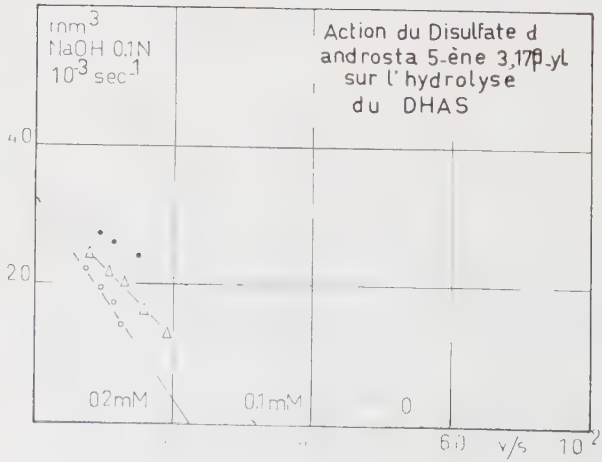


FIG. 60 : Inhibition de la stéroïde-sulfatase par le disulfate d'androsta 5-ène 3 β, 17 β-yl

non hydrolysé par la méthode de Vlitos et du stéroïde libéré par la réaction de Zimmermann après extraction par le chlorure de méthylène.

Le pH optimum d'hydrolyse est 4,5-5 (*fig. 61*).

La concentration saturante du substrat : 0,8 mM (*fig. 62*).

Les constantes de Michaelis sont calculées d'après les quantités de stéroïde libéré durant les soixante premières minutes d'hydrolyse (*fig. 63-63 bis*).

Pour le sulfate de 3 α-étiocholanolone :

$K_m = 3{,}07 \cdot 10^{-3}$ M
$V_m = 13{,}2$ mμ M . min^{-1}
$k_s = 36$ mμ M . min^{-1}/mg N

Pour le sulfate de 3 β-étiocholanolone :

$K_m = 6{,}35 \cdot 10^{-3}$ M
$V_m = 12{,}8$ mμ M . min^{-1}
$k_s = 35$ mμ M . min^{-1}/mg N

La lenteur de l'hydrolyse peut s'expliquer par la faible affinité de l'enzyme pour ces deux substrats.

Il faut noter que l'affinité est plus grande pour le sulfate de 3 α que pour le sulfate de 3 β. Or, dans ces dérivés à fonction alcool en 3 du 5 β-androstane, c'est la position 3 α qui est équatoriale, donc plus réactive. Contrairement aux dérivés du 5 α-androstane, la fonction ester en position axiale est cependant hydrolysée.

C'est vraisemblablement le même enzyme qui hydrolyse le DHAS et ces esters-sulfates. Le sulfate d'α-étiocholanolone inhibe compétitivement l'hydrolyse du DHAS.

$K_i = 0{,}4 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,1

L'hydrolyse est inhibée par l'ion Cl^-. On constate, quand la concentration en Cl^- est 0,4 M, une inhibition de 25 % pour l'hydrolyse du sulfate de 3 α-étiocholanolone, 23 % pour le sulfate de 3 β-étiocholanolone.

B) DERIVES DU PREGNANE

1) Sulfate de pregnanolone (*Sulfate de 5 α-pregnane 3 β-yl 20-one*) :

Le pH optimum d'hydrolyse est 4,5-4,8 (*fig. 64*).

La concentration saturante du substrat est 0,3 mM. On constate une inhibition par un excès de substrat.

La courbe d'hydrolyse totale du substrat (*fig. 68*) montre qu'une nouvelle addition d'enzyme au bout de dix-huit minutes n'entraîne pas d'hydrolyse supplémentaire.

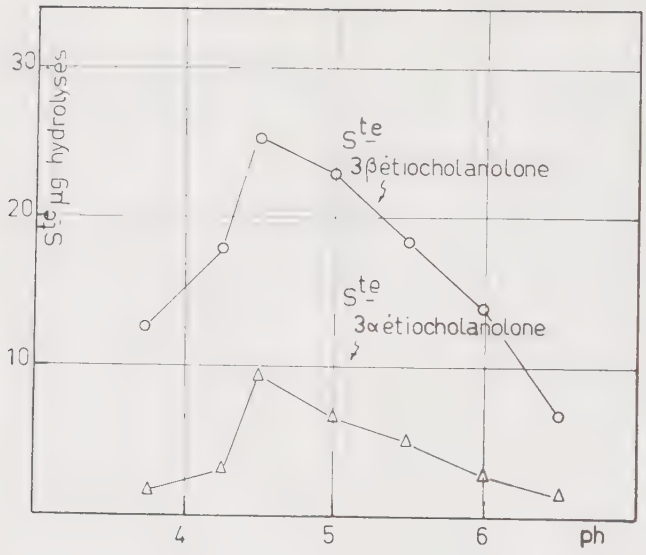


FIG. 61 : pH optimum d'hydrolyse du sulfate de 3 α et du sulfate de 3 β-étiocholanolone par la stéroïde sulfatase

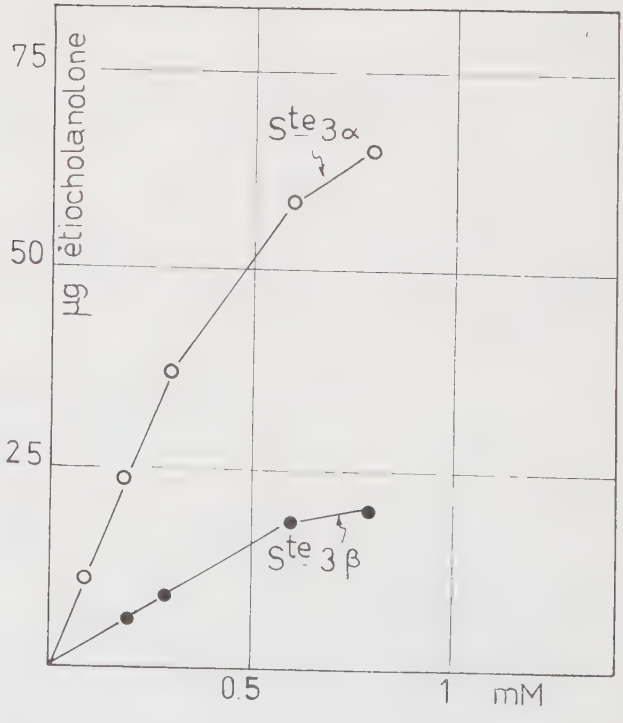


FIG. 62 : Concentrations saturantes de sulfate de 3 α et du sulfate de 3 β-étiocholanolone pour la stéroïde-sulfatase

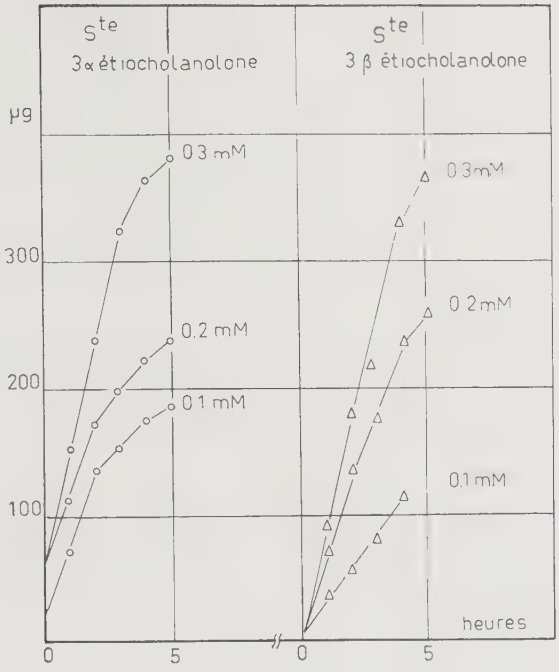


FIG. 63 : Vitesses d'hydrolyse du sulfate de 3 α et du sulfate de 3 β-étiocholanolone par des quantités équivalentes d'enzyme en fonction de concentrations : 0,1, 0,2, 0,3 mM de substrat

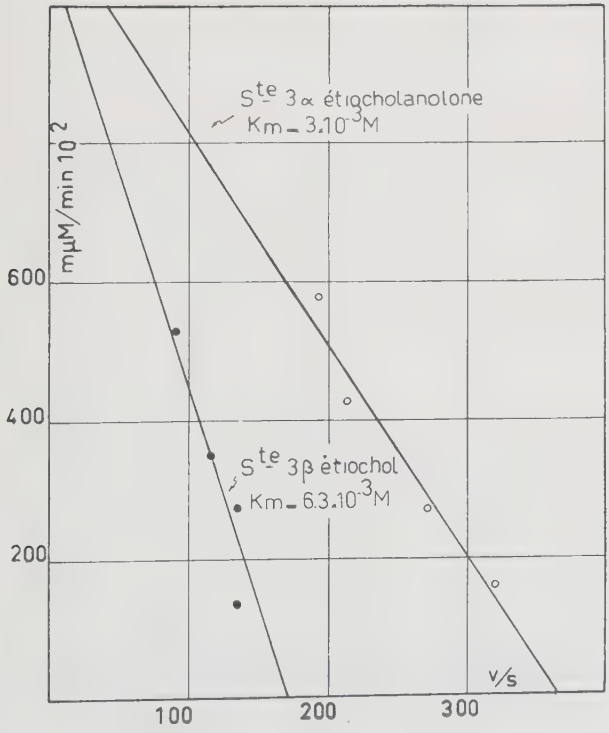


FIG. 63 *bis* : Droites tracées suivant la représentation d'EADIE à partir des résultats calculés des données de la *figure 63*

La vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en enzyme : entre 0 et 1 ml de solution enzymatique.

La constante de Michaelis (*fig. 65*) est :

$K_m = 0{,}023 \cdot 10^{-3}$ M

$k_s = 79$ mμ M . min^{-1}/mg N

— *Action de l'ion Cl⁻ :* L'hydrolyse est inhibée par l'ion Cl^- qui ne modifie pas l'affinité :

$K_i = 0{,}88$ M

On a comparé à l'action de l'ion Cl^- celles des ions I^-, Br^-, NO_3^-. Ces anions se comportent comme l'ion Cl^-.

2) Sulfate de pregnènolone (*Sulfate de pregna 5-ène 3 β-yl 20-one*) :

Le pH optimum d'hydrolyse est 4,8 (*fig. 64*), la concentration saturante du substrat : 0,5 mM. Comme dans le cas de l'hydrolyse du sulfate de pregnanolone, un excès de substrat entraîne une inhibition de l'hydrolyse.

La vitesse d'hydrolyse est fonction linéaire de la concentration en enzyme de 0 à 0,5 ml de préparation enzymatique.

La constante de Michaelis à pH 4,8, en milieu 0,1 M en chlorure de potassium, est :

$K_m = 0{,}021 \cdot 10^{-3}$ M (*fig. 65*)

$k_s = 98$ mμ M . min^{-1}/mg N

— *Action de l'ion Cl⁻ :* Comme pour l'hydrolyse du sulfate de pregnanolone, l'ion Cl^- est inhibiteur :

$K_i = 1{,}19$ M

Les stéroïdes-sulfates étudiés jusqu'à présent étaient des esters de fonction alcool incluse dans un cycle. Nous allons maintenant étudier la cinétique de l'hydrolyse d'un ester-sulfate de stéroïde dont la fonction alcool estérifiée fait partie d'une chaîne latérale.

C) DERIVES DE LA CORTISONE

Sulfate de cortisone :

Nous avons vu que l'hydrolyse des sulfates de désoxycorticostérone, de substance S et de cortisone par les fractions purifiées d'SHP, était réalisée à 99 % en une heure. Nous avons étudié en détail la cinétique de l'hydrolyse du sulfate de pregna 4-ène 21-yl 17 α-ol 3, 11, 20 trione : cortisone 21-sulfate.

Le pH optimum d'hydrolyse est 4,7 (*fig. 66*). La concentration saturante du substrat : 0,6 mM (*fig. 67*). La courbe d'hydrolyse totale du substrat (*fig. 68*) montre qu'une nouvelle addition d'enzyme au bout de quarante minutes n'entraîne pas d'hydrolyse supplémentaire.

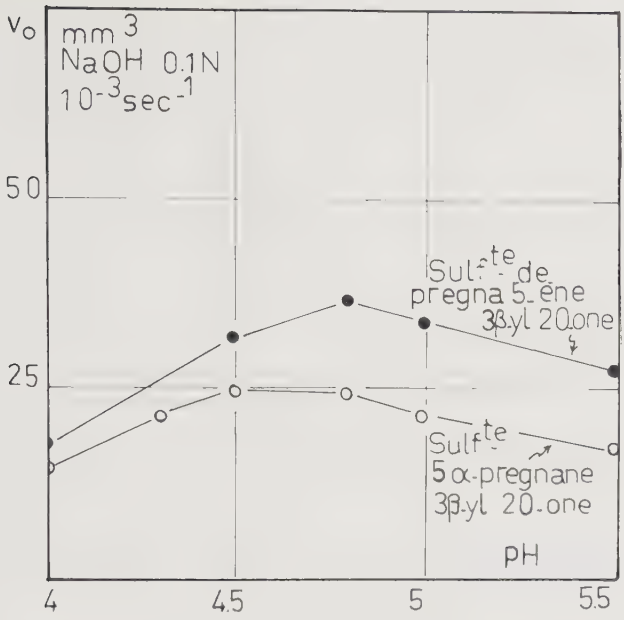


FIGURE 64 : pH optimum d'hydrolyse du sulfate de pregna 5-ène 3 β-yl 20-one et du sulfate de 5 α-pregnane 3 β-yl 20-one par la stéroïde-sulfatase

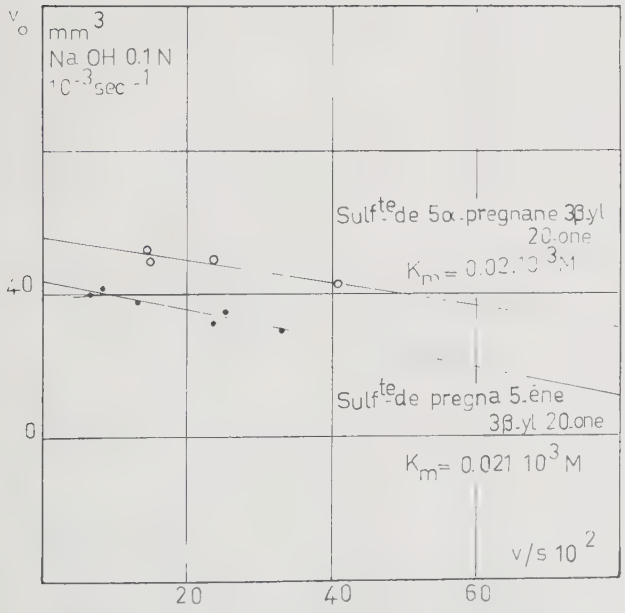


FIGURE 65 : Hydrolyse du sulfate de 5 α-pregna 3 β-yl 20-one et du sulfate de pregna 5-ène 3 β-yl 20-one par la stéroïde sulfatase. Représentation suivant EADIE

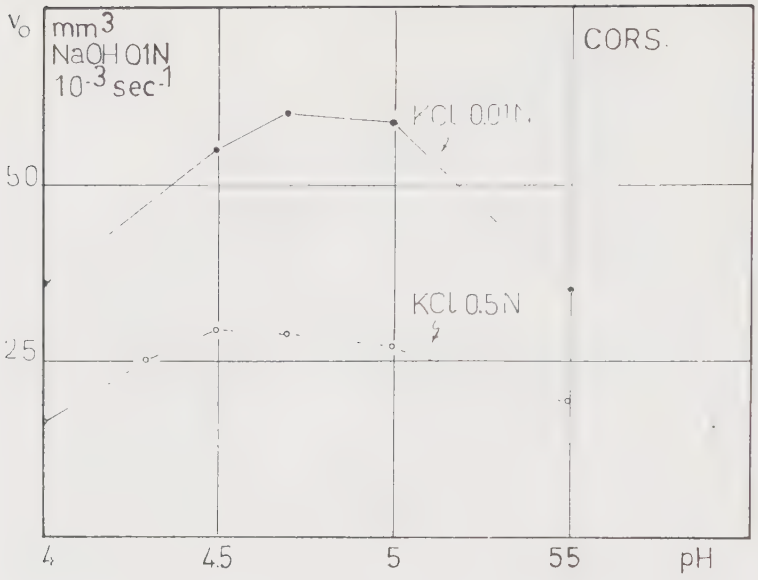


FIG. 66 (*ci-dessus*) : pH optimum d'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate. Influence de la concentration de Cl^-

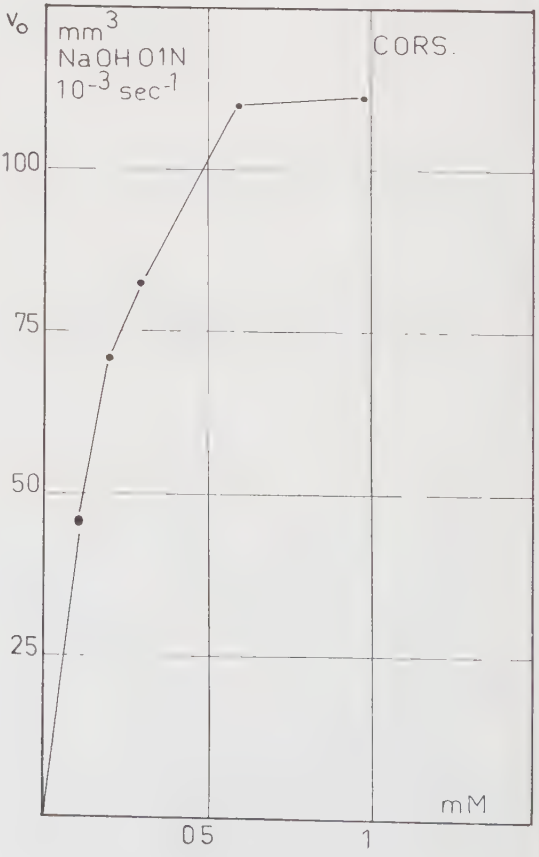


FIG. 67 (*ci-contre*) : Concentration saturante de cortisone 21-sulfate pour la cortisone-sulfatase

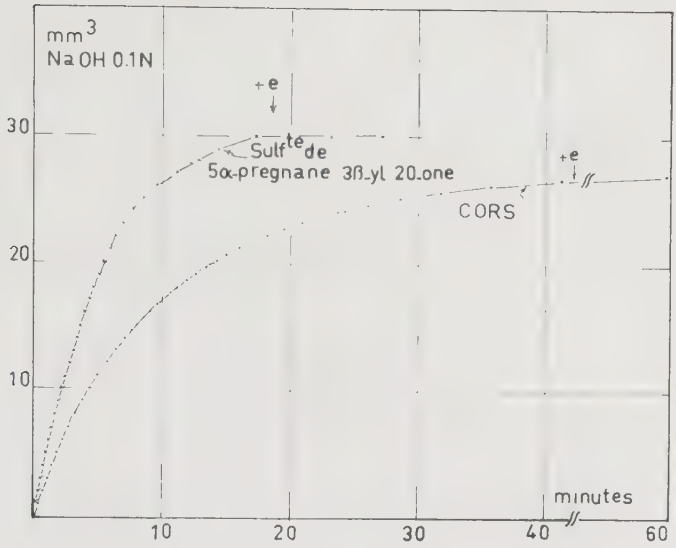


FIGURE 68 : Hydrolyse totale du sulfate de 5 α-pregna 3 α-yl 20-one par la stéroïde-sulfatase et du cortisone 21-sulfate par la cortisone-sulfatase. Addition, au milieu d'incubation, d'une nouvelle quantité d'enzyme (+ e) quand la vitesse d'hydrolyse tend vers zéro

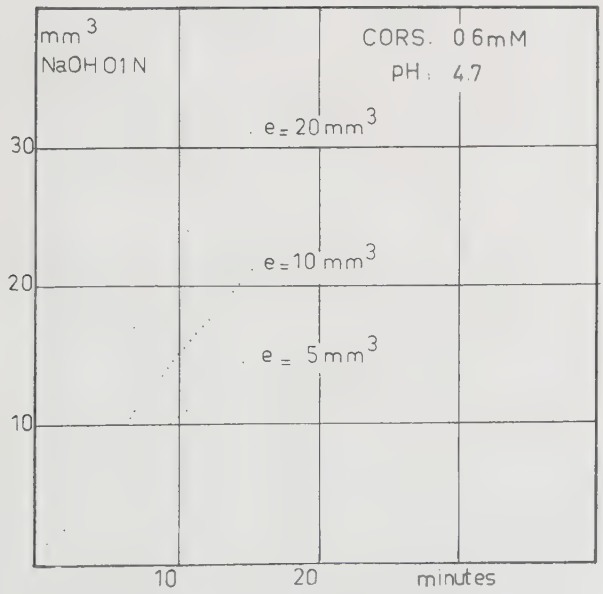


FIGURE 69 : Vitesses d'hydrolyse du cortisone 21-sulfate en fonction de la concentration de l'enzyme

La vitesse d'hydrolyse est fonction de la concentration en enzyme (*fig. 69*) dans la zone des concentrations où nous l'avons étudiée.

La constante de Michaelis à pH : 4,7, en milieu 0,01 M en chlorure de potassium, est :

$K_m = 0{,}20 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,015 (*fig. 70*)
$V_m = 107 \cdot 10^{-3}$ mm³ NaOH 0,1 N . sec⁻¹
$k_s = 82 \cdot 10^{2}$ mμ M . min⁻¹/mg N

— *Action de l'ion Cl^- :* L'action est nulle de 0,01 M à 0,1 M. Au delà, il y a inhibition non compétitive (*fig. 70*) :

$K_i = 0{,}25$ M $\pm$ 0,02

L'ion Cl^- ne modifie pas significativement le pH optimum. L'action inhibitrice de l'ion Cl^- est liée à la force ionique. Le chlorure de potassium et le chlorure de calcium à force ionique égale donnent des effets identiques (*fig. 71* et *72*). L'action porte sur k_s. Donc, vraisemblablement une ionisation intervient au niveau de la décomposition du complexe enzyme-substrat.

Les anions Br^-, I^- montrent une action plus prononcée que l'ion Cl^-. Ainsi :

pour KCl 0,5 M, $v_0 = 30{,}2 \cdot 10^{3}$ mm³ sec⁻¹
pour KBr 0,5 M, $v_0 = 22{,}2$
pour KI 0,5 M, $v_0 = 14{,}3$

Dans le cas de l'hydrolyse du sulfate de pregnènolone, ces anions avaient donné des effets identiques.

— *Action de l'ion SO_4^{2-}* (*fig. 73*) : Comme dans le cas de l'hydrolyse du DHAS, il y a inhibition.

Elle est non compétitive jusqu'à la concentration 0,5 mM en SO_4^{2-}.

$K_i = 0{,}3 \cdot 10^{-3}$ M

— *Action de l'ion PO_4^{3-}* (*fig. 73*) : Mêmes constatations que lors de l'hydrolyse du DHAS.

Ici l'inhibition est non compétitive seulement jusqu'à une concentration en $PO_4^{3-} \leqslant 0{,}5$ mM au delà la pente des droites, v en fonction de v/s, augmente mais V'_m est inférieure à V_m sans inhibiteur.

$K_i = 0{,}35 \cdot 10^{-3}$ M $\pm$ 0,09

— *Action de l'ion borate :* Cet ion provoque une inhibition non compétitive de l'hydrolyse (*fig. 74*) :

$K_i = 0{,}20 \cdot 10^{-3}$ M (*fig. 73*)

Nous avons trouvé le même comportement de cet ion au cours de l'hydrolyse du DHAS.

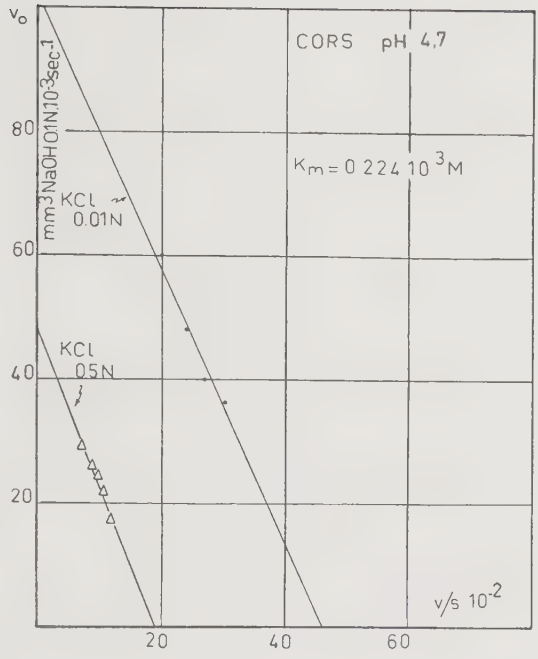
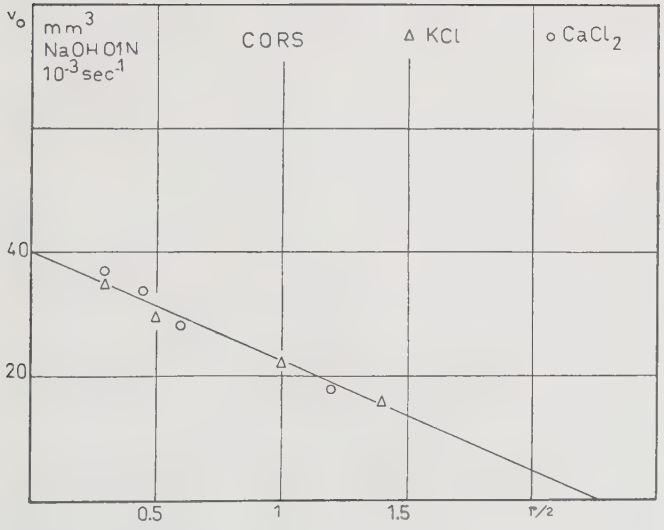


FIG. 70 (*ci-contre*) : Action de l'ion Cl^- sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate

FIG. 71 (*ci-dessous*) : Actions comparées du KCl et du $CaCl_2$ sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate. Vitesses initiales en fonction de la force ionique



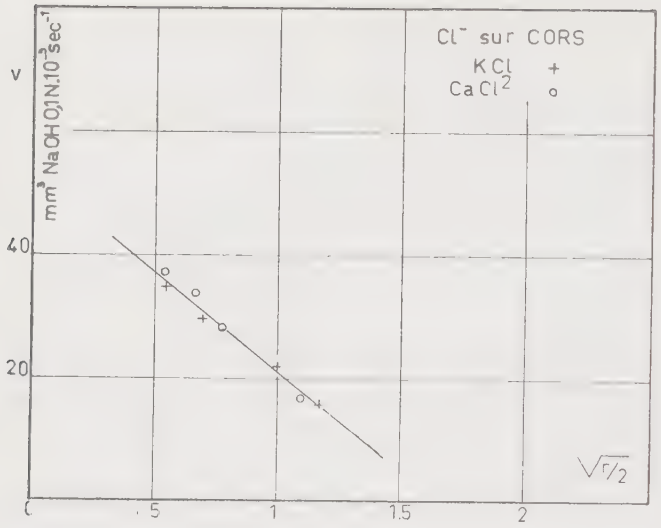


FIG. 72 (*ci-contre*) : Actions comparées du KCl et du $CaCl_2$ sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate. Vitesses initiales en fonction de la racine carrée de la force ionique

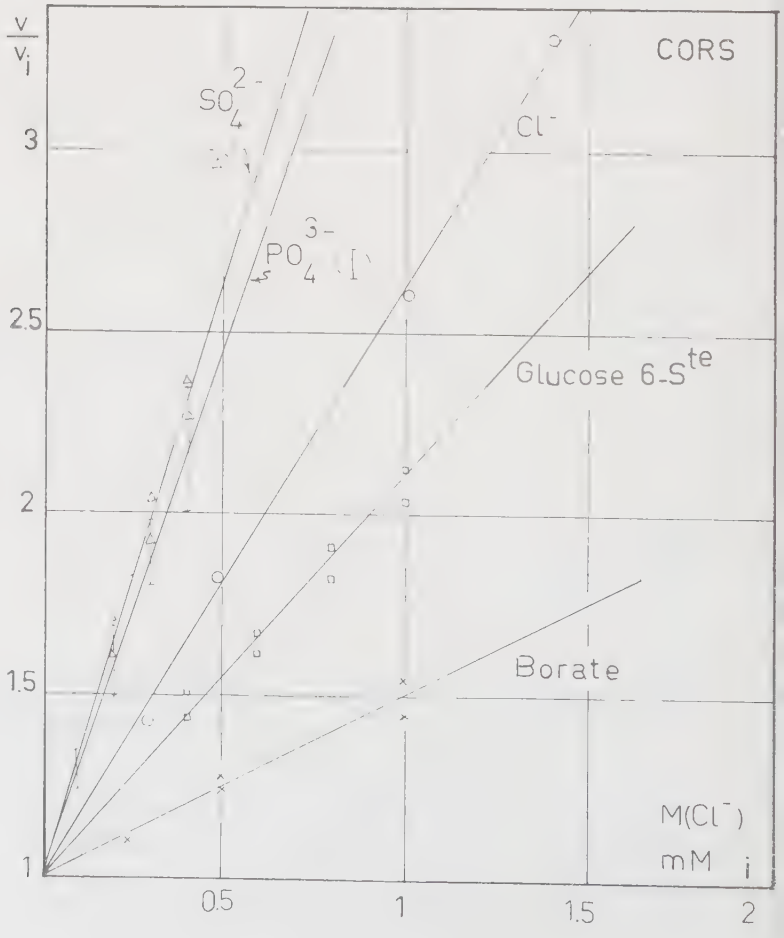


FIG. 73 (*ci-dessous*) : Inhibition de l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate par les ions : sulfate, phosphate, borate et par le glucose 6-sulfate.

En ordonnées : le rapport : vitesse initiale sans inhibiteur/vitesse initiale en présence d'inhibiteur

En abscisses : les concentrations d'inhibiteur

— *Action du glucose et du glucose 6-sulfate :* Roy [89] avait émis l'hypothèse que l'enzyme hydrolysant le cortisone 21-sulfate pourrait être la glucose-sulfatase. Il obtenait une inhibition de l'hydrolyse par le glucose.

Dodgson [17] a montré que le SHP ne contient pas de glucose-sulfatase. Nous n'avons pas observé d'hydrolyse du glucose 6-sulfate par nos fractions purifiées en prolongeant l'hydrolyse, suivie par potentiométrie, pendant soixante minutes.

Le glucose n'entraîne pas de modification de la vitesse initiale d'hydrolyse :

Glucose	v_0 *mm³ NaOH 0,1 N . 10^{-3} . sec^{-1}*
0	38,4 — 37,7
10 mM	38,4
20 mM	40

Le glucose 6-sulfate * inhibe non compétitivement l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate (*fig. 75*) :

$$K_i = 0{,}46 \cdot 10^{-1} M \pm 0{,}02$$

— *Action du DHAS :* L'enzyme responsable de l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate ne serait-il pas celui qui hydrolyse le DHAS ?

Il était important d'étudier ce que devenait l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate en présence de DHAS, attendu que pour suivre l'hydrolyse de ces stéroïdes-sulfates, il faut faire intervenir 20 fois plus d'enzyme pour hydrolyser DHAS que pour hydrolyser le cortisone 21-sulfate.

On constate une inhibition compétitive (*fig. 76*).

La valeur de K_i est égale à :

$$K_i = 0{,}036 \cdot 10^{-3} M \pm 0{,}003$$

valeur tout à fait comparable, aux erreurs d'expériences près, au K_m déterminé pour l'hydrolyse du DHAS.

Il semble donc que l'on peut affirmer que c'est le même enzyme qui est responsable de l'hydrolyse des deux substrats.

III. — ETUDE THERMODYNAMIQUE DE L'HYDROLYSE DES ESTERS-SULFATES

L'étude des variations de la vitesse de la réaction en fonction de la température peut permettre dans certains cas d'atteindre la valeur

(*) Le glucose 6-sulfate employé a été adressé par Dodgson à notre collègue Henry. Nous l'en remercions.

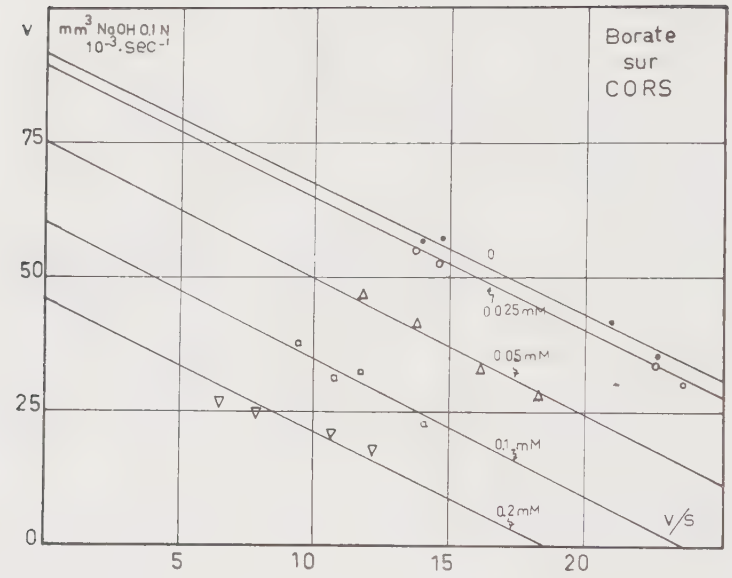


FIGURE 74 : Action du borate sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate. Représentation suivant EADIE

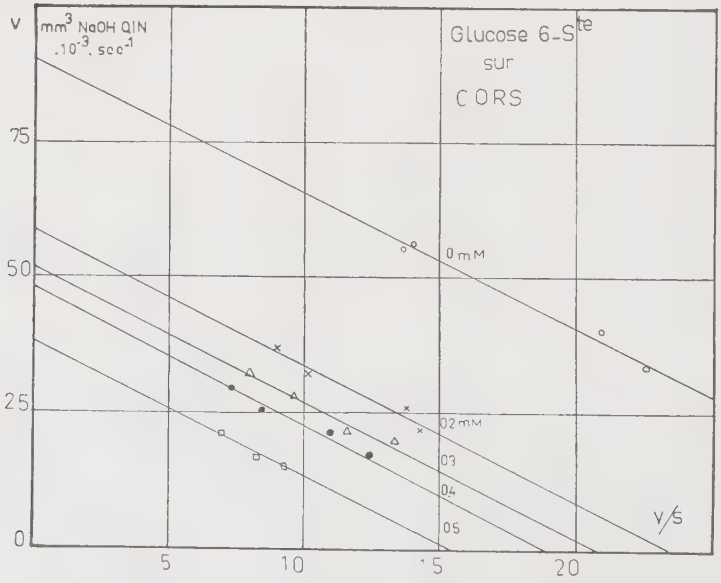


FIGURE 75 : Action du glucose 6-sulfate sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate

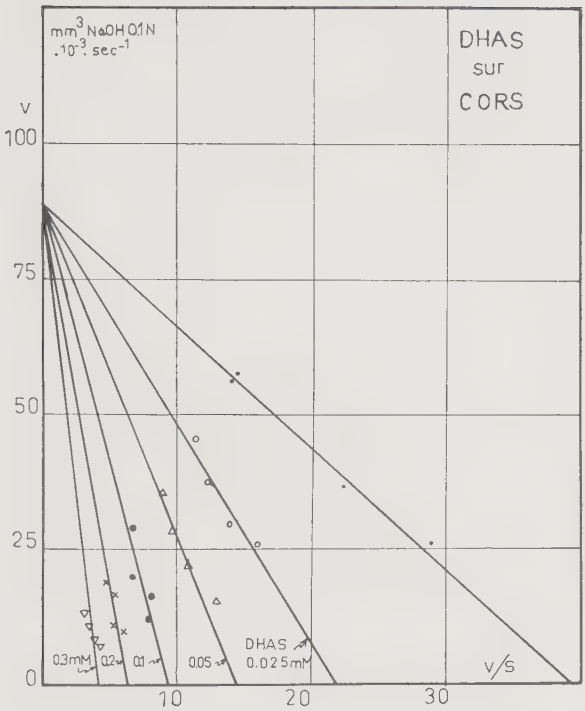


FIG. 76 : Action du sulfate de déhydroépiandrostérone sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate

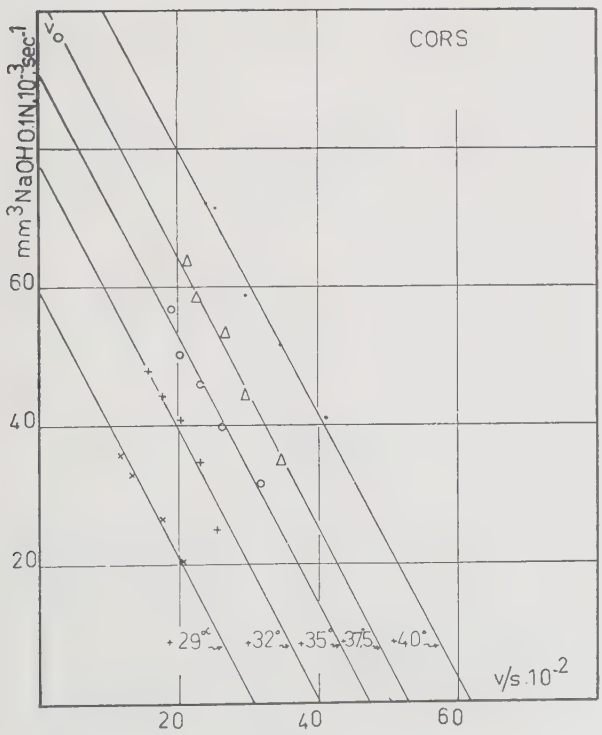


FIG. 77 : Influence de la température sur l'hydrolyse enzymatique du cortisone 21-sulfate. Représentation suivant EADIE. La pente de la droite (K_m) ne varie pas avec la température, dans l'intervalle + 29° - + 40°C

de l'énergie d'activation expérimentale E de la réaction. Mais dans le cas général, l'effet de la température sur la vitesse d'hydrolyse résulte de la contribution de deux facteurs : l'effet de la température sur k_s d'une part, l'effet de température sur K_m d'autre part.

En effet, l'équation des vitesses est de la forme :

$$v = \frac{k_s \, e \, s}{K_m + s}$$

La dérivée du logarithme de la vitesse par rapport à l'inverse de la température absolue 1/T est :

$$\frac{\delta \log v}{\delta \left(\frac{1}{T}\right)} = \frac{\delta \ln k_s}{\delta \left(\frac{1}{T}\right)} + \frac{K_m}{s + K_m} \cdot \frac{\delta \ln K_m}{\delta \left(\frac{1}{T}\right)}$$

On a donc :

$$\mu = E + \frac{K_m}{s + K_m} \Delta H_m$$

Dans cette expression, μ représente l'énergie d'activation globale de la réaction, E la variation d'énergie d'activation de la réaction et ΔH_m la variation d'enthalpie correspondant à la formation du complexe enzyme-substrat.

Si la constante de Michaelis ne varie pas avec la température (*fig. 77*) ou si elle reste petite devant la concentration du substrat, le deuxième facteur est négligeable et l'énergie d'activation expérimentale correspond à la valeur de E.

Dans ces conditions, il est possible d'obtenir E à partir des variations de log v_o en fonction de 1/T. La pente de la droite ainsi obtenue donne à un facteur près l'énergie d'activation expérimentale :

$$E = \text{pente de la droite} \times R \times 2{,}3$$

où R est la constante des gaz

a) Sulfate de DHA

Nous avons obtenu, d'après les données de la *figure 78*, une droite (*fig. 80*) dont :

la pente = 0,28
E = 12.700 calories
$\Delta H^{\ddagger}$ = E — RT = 12.100 ± 500 calories

b) Sulfate de pregnènolone

A partir des résultats de la *figure 79*, on a tracé une droite (*fig. 80*) dont :

la pente = 0,34
E = 15.500 calories
$\Delta H^{\ddagger}$ = 15.500 ± 500 calories

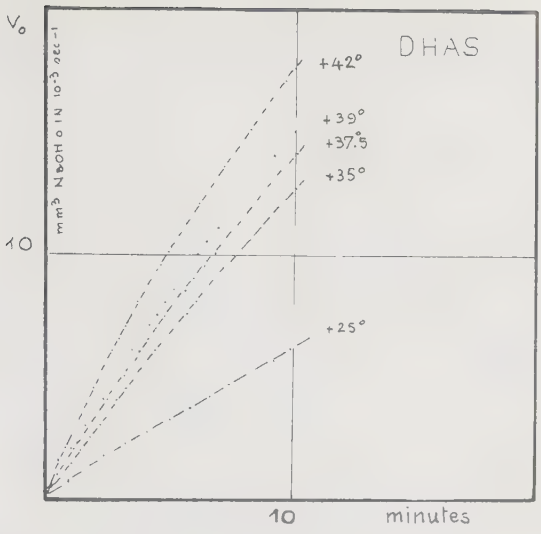


FIG. 78 : Vitesses initiales d'hydrolyse enzymatique du sulfate de déhydroépiandrostérone en fonction de la température

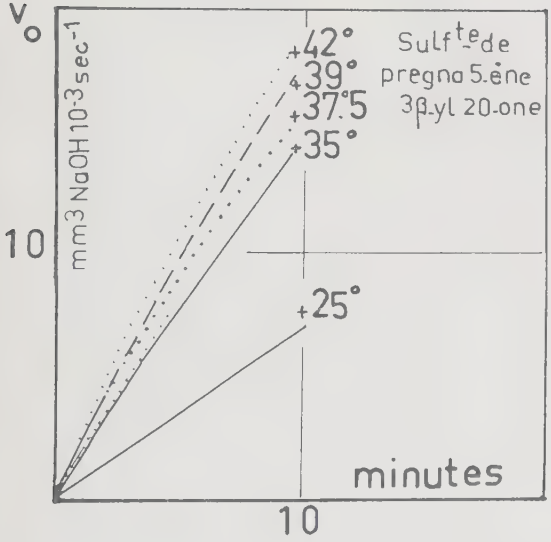
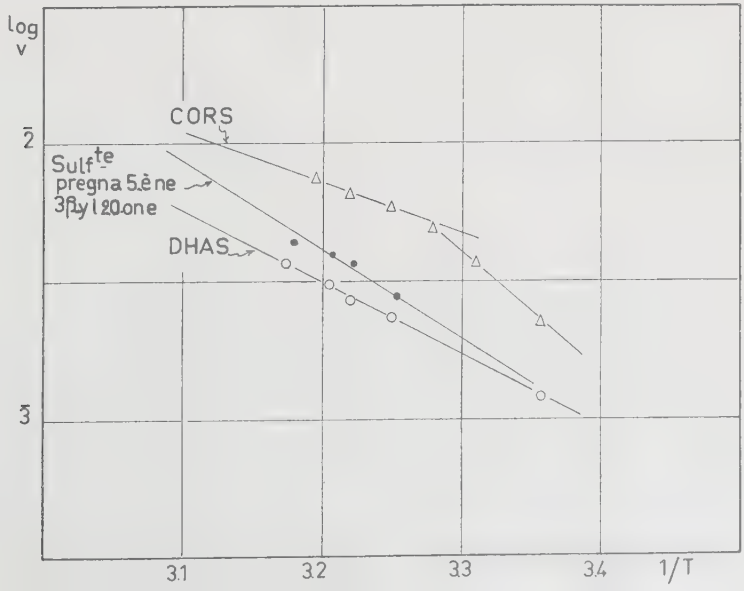


FIG 79 (*ci-contre*) : Action de la température sur la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique du sulfate de pregna 5-ène 3 β-yl 20-one

FIG. 80 (*ci-dessous*) : Energie d'activation expérimentale

En ordonnées : les log. des vitesses initiales

En abscisses : les inverses des températures absolues



c) Cortisone 21-sulfate

Les points log v_o en fonction de 1/T se situent sur deux segments de pentes différentes (*fig. 80*).

Pour les températures de 25° à 32° :

pente = 0,45
E = 20.500 calories
$\Delta H^{\neq}$ = 20.000 ± 500 calories

Pour les températures supérieures :

pente = 0,205
E = 12.400 calories
$\Delta H^{\neq}$ = 12.000 ± 500 calories

d) Nitrocatéchol-sulfate

Les résultats obtenus en dosant le NC libéré au bout de quinze minutes permettent de tracer une droite dont la pente pour les températures comprises entre 22° et 34° est : 0,085.

E = 3.871 calories

Au delà de + 34°, les valeurs de v_o diminuent, l'aspect des droites log v_o en fonction de 1/T suggère une inhibition partielle de l'enzyme par dénaturation lorsque la température augmente, ou bien qu'un phénomène supplémentaire a lieu au cours de l'hydrolyse (oxydation par exemple).

CONCLUSIONS

Le principal problème qui s'est posé au cours de ce travail est celui-ci :

L'hydrolyse des esters-sulfates étudiés est-elle réalisée par le même enzyme ou par des enzymes différents ?

Ces enzymes, s'ils sont plusieurs, précipitent dans les mêmes conditions de pH et de concentrations en sel ou en solvant. Cependant, d'un fractionnement à l'autre, il arrive que les activités relatives varient. On pense que cela est dû plutôt aux méthodes de détermination des activités par mesure du produit hydrolysé au bout d'un temps fixé, et à la nécessité, devant laquelle on est placé, de diluer la préparation à examiner au dix millième pour l'arylsulfatase, au millième pour l'hydrolyse du cortisone-sulfate, alors qu'il faut l'employer pure pour hydrolyser le DHAS.

Les résultats de la purification, par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, ont montré que c'est dans la même fraction qu'apparaît l'activité enzymatique sur les différents substrats.

L'étude cinétique, beaucoup plus précise et plus sélective, nous conduit à imputer à la même sulfatase l'hydrolyse des stéroïdes-sulfates et du cortisone-sulfate (*Tableau XI*).

L'expérience a montré une compétition de ces différents substrats entre eux vis-à-vis de l'enzyme.

Quantitativement, on retrouve la même constante d'affinité du DHAS pour l'enzyme, soit par la détermination de la constante de Michaelis de l'hydrolyse du DHAS, soit par la détermination de la constante d'inhibition du DHAS, quand il intervient comme inhibiteur compétitif de l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate.

* *

L'analyse des constantes cinétiques et thermodynamiques donne quelques informations, d'une part sur l'association enzyme-substrat et les facteurs stériques qui déterminent cette association, d'autre part sur la décomposition de ces complexes.

TABLEAU XI

STÉROÏDES - SULFATES

ANDROSTANE 5α | Δ4 ou Δ5 | 5β

SULFATE DE

5α-androstane 3α-yl 17-one

non hydrolysé

inhib/DHAS n c

$K_i = 0.5\ 10^{-3}$ M

5α-androstane 3β-yl 17-one

$K_m = 0.032\ 10^{-3}$ M

$K_M = 31.2$

Sulfte 5α-androstane 17β-yl 3-one

non hydrolysé

inhib/DHAS : c

$K_i = 0.05.10^{-3}$ M

DÉHYDROÉPIANDROSTÉRONE SULFTE

Sulfate d'androsta 5-ène 3β-yl 17-one

$K_m = 0.028.10^{-3}$ M

$K_M = 36$

$k_s = 45 \frac{m\mu M.min^{-1}}{mg\ N}$

$\Delta H^{\neq} = 12.000 \pm 500$ calories

Ions inhibiteurs — K_I

Cl^- : n.c ... 1 M

$SO_4^=$: n.c .... $0.4.10^{-3}$ M ($\leqslant 0.5$ m M) ±0.05

$PO_4^{\equiv}$: n.c .... $0.8.10^{-3}$ M ($\leqslant 0.5$ m M) ±0.1

Borate n.c. ... $1.26.10^{-3}$ M

TESTOSTÉRONE SULFATE

Sulfte androsta 4-ène 17 β-yl 3-one

non hydrolysé

inhib / DHAS : c $K_i = 0.018.10^{-3}$ M

Disulfate androsta 5-ène 3β - 17β-yl

$K_m = 0.017\ 10^{-3}$ M

$K_M = 57$

$k_s = 23$ mμM.min^{-1}/mg N

inhib. / DHAS c $K_i = 0.07\ 10^{-3}$ M

SULFATE DE 5β-androstane

3α-yl 17-one	3β-yl 17-one
ÉTIOCHOLANOLONE	β ÉTIOCHOLAN
$K_m = 3.07.10^{-3}$ M	$6.35\ 10^{-3}$ M
$K_M = 0.3$	0.15
$k_s = 36 \frac{m\mu M.min^{-1}}{mg\ N}$	35
inhib / DHAS c	
$K_I = 0.4.10^{-3}$ M	

PREGNANE 5α | Δ4 ou Δ5 | 5β

SULFATE DE

5α-pregnane 3α-yl 20-one

non hydrolysé

5α-pregnane 3β-yl 20-one

$K_m = 0.023.10^{-3}$ M

$K_M = 43.4$

$k_s = 79 \frac{m\mu M.min^{-1}}{mg N}$

Cl^-

inhib. : n.c

$K_i = 0.88$ M

SULFATE DE PREGNÉNOLONE

pregna 5-ène 3β-yl 20-one

$K_m = 0.02\ 10^{-3}$ M

$K_M = 47.5$

$k_s = 70$ mμM.min^{-1}/mg N

$\Delta H^{\neq} = 15.000 \pm 500$ calories

SULFATE DE CORTISONE

pregna 4-ène 21-yl 17-ol 3,11,20-trione

$K_m = 0.2.10^{-3}$ M

$K_M = 5$

$k_s = 82.10^2$ mμM.min^{-1} / mg N

$\Delta H^{\neq} = 20.000 \pm 500$ calories (+25°+32°C)

$= 12.000 \pm 500$ (+32°+40°C)

Inhibiteurs — K_I

Cl^- : n.c ... 0.25 M ± 0.02

$SO_4^=$: n.c ≤ 0.05 mM .... $0.30.10^{-3}$ M

$PO_4^{\equiv}$: n.c ≤ 0.05 mM .... $0.35.10^{-3}$ M

Borate : n.c ..... $0.20.10^{-3}$ M

Glucose 6-sulfate : n.c. $0.46.10^{-3}$ M

DHAS : c ..... $0.036.10^{-3}$ M

TABLEAU XII

ARYLSULFATES

	NCS	PPS	OES
pH optimum	7.2 t^{on} tris-maléiq.	5.6 t^{on}-acét 6 t^{on}-tris-maléiq	5.0 t^{on}-acét. 5.2 t^{on}-tris-maléiq
conc. saturante	15 mM	0.6 mM conc.> inhib	0.5 mM
K_m	$0.45.10^{-3}$ M	$0.15.10^{-3}$ M	$0.11\ 10^{-3}$ M
$K_M = 1/K_m$	2.2	6.6	9
$k_s = \frac{m\mu M.min^{-1}}{mg\ N}$	84.10^3	47.10^2	

Cl^-	inhibition %
0.25 M	13
0.50 M	26
1.0 M	37
Energie d'activation	3870 calories de 22°C à 34°C

L'enzyme n'exerce aucune action hydrolysante sur les composés 3 α-5 α. Or, ceux-ci peuvent se fixer sur l'enzyme puisqu'ils interviennent comme inhibiteurs dans l'hydrolyse du DHAS, mais l'inhibition est du type non compétitif. Bien que se fixant sur l'enzyme, ils ne se fixent pas sur les centres actifs de ce dernier, probablement parce que leur configuration stéréochimique est inadéquate.

Les composés de la série A/B trans ou 5 α ont une affinité beaucoup plus grande pour l'enzyme que les composés de la série A/B cis ou 5 β. Les constantes de Michaelis varient en moyenne dans un rapport 100. Les composés A/B trans ont donc une structure beaucoup plus favorable à la fixation de l'enzyme que les composés A/B cis, toutefois les valeurs des k_s sont d'un ordre de grandeur assez peu différent.

Les composés où le sulfate est en 17 β ne sont pas hydrolysés bien qu'ils se fixent sur les centres actifs de l'enzyme avec une affinité du même ordre de grandeur que les substrats. Il est possible que dans ce cas la répartition des charges soit telle que l'activation du complexe ne puisse pas se faire.

Les valeurs obtenues pour l'énergie d'activation sont peu différentes pour les différents substrats. Leur ordre de grandeur est celui que l'on trouve généralement dans la littérature pour l'hydrolyse enzymatique de liaisons esters.

Ces valeurs ne peuvent donc rendre compte de la grande différence de vitesse d'hydrolyse du cortisone 21-sulfate et des composés portant le groupement sulfate en 3 β ou 3 α. On peut penser que ceci est relié à un effet d'entropie, le groupement sulfate en position terminale possèderait une liberté de mouvement beaucoup plus grande.

Toutefois, il nous est impossible de calculer les valeurs ΔF^* de la variation d'énergie libre d'activation du complexe et ΔS^* de la variation d'entropie d'activation correspondant aux différentes réactions, tant que l'enzyme n'est pas totalement purifié.

Ces données apportent quelque lumière sur le mécanisme d'action des sulfatases. S'il reste encore bien des imprécisions, le résultat le plus positif que nous avons pu apporter est celui de l'identité de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase. Il reste à déterminer si l'arylsulfatase est un enzyme différent ou le même enzyme (*Tableau XII*).

RESUME

Le but de ce travail est la préparation et la purification des sulfatases du suc digestif d'*Helix pomatia*.

Ce suc est capable d'hydrolyser des arylsulfates, des stéroïdes-sulfates, le cortisone-sulfate. On a, de ce fait, admis la présence d'arylsulfatase, de stéroïde-sulfatase, de cortisone-sulfatase. C'est à ces sulfatases que nous avons limité cette étude.

I. — La présence de β-glucuronidase nous a conduit à suivre le sort de cet enzyme au cours des fractionnements et à chercher le moyen d'obtenir des préparations de sulfatases dépourvues de cet enzyme. La β-glucuronidase est dénaturée aux pH fortement alcalins, les sulfatases étudiées sont dénaturées par la chaleur à des températures où la β-glucuronidase demeure intacte. Ces deux caractères permettent l'obtention de préparations exemptes de β-glucuronidase ou de ces sulfatases.

II. — Le fractionnement des protéines du suc est effectué par les sels, par les solvants : acétone, éthanol.

Les sulfatases sont précipitées ensemble. On observe seulement des variations de leurs activités relatives dans les différentes fractions.

Le fractionnement par les sels n'est pas retenu, les sulfates et les phosphates étant des inhibiteurs puissants de ces sulfatases.

Le fractionnement par l'acétone à pH 4,5 permet de rassembler dans deux fractions (46-52 % et 52-58 %) la majeure partie des activités sulfatasiques. Ces fractions représentent 8 % de l'azote protéique du suc mis en œuvre.

Le fractionnement par l'éthanol à pH 4,1 des fractions acétoniques actives permet un nouvel enrichissement. Les activités sulfatasiques sont dans les précipités obtenus entre 50 et 60 % d'éthanol d'une part, et 60 et 80 % d'autre part. L'azote de ces fractions est égal à 3 % de l'azote protéique du suc.

Les fractions ainsi obtenues ont des activités spécifiques très élevées :

— arylsulfatase : 1.600 à 1.800 u/μg N contre 70-160 u/μg N dans le suc ;
— stéroïde-sulfatase : 0,7 à 1 u/μg N contre 0,03-0,08 u/μg N dans le suc ;
— cortisone-sulfatase : 25-34 u/μg N contre 1,5-3 u/μg N dans le suc.

Ces activités sont supérieures à celles indiquées dans la littérature pour les sulfatases d'autres origines ou pour la préparation d'hépato-pancréas d'*Helix pomatia* (stade 5) obtenue par Dodgson [17] et par Dodgson et Powell [22]. Les activités trouvées par ces auteurs, transposées en unités adoptées ici, sont :

— arysulfatase : 306 u/μg de protéine ;
— stéroïde-sulfatase : 37 u/1 ml de préparation ;
— cortisone-sulfatase : 250 u/1 ml de préparation.

Une unité (u) correspond à la quantité d'enzyme qui libère 1 μg de phénol ou de stérol en une heure à la température de + 37°5.

Ces fractions ont permis l'étude cinétique de l'hydrolyse des stéroïdes-sulfates par la méthode potentiométrique à pH constant, méthode beaucoup plus précise que la mesure de l'activité par dosage d'un des produits d'hydrolyse au bout d'un temps arbitrairement choisi.

III. — La purification des sulfatases est tentée par les méthodes d'électrophorèse sur amidon, sur cellulose éthanolysée, à travers un gel d'amidon. Une séparation nette des sulfatases ne peut être obtenue. La chromatographie sur DEAE-cellulose aboutit à une fraction où se trouvent rassemblées les activités sulfatasiques : l'azote de cette fraction représente 1 % de l'azote du suc.

Les fractions acétono-éthanoliques donnent quatre bandes de protéines à l'électrophorèse à travers un gel d'amidon.

La fraction obtenue après chromatographie sur DEAE-cellulose ne donne qu'une bande à l'électrophorèse à travers gel d'amidon.

Cette fraction a les activités spécifiques suivantes :

— arylsulfatase : 4.900-9.000 u NC/μg N (enrichissement par rapport au suc : 70 x) ;
— stéroïde-sulfatase : 7-11 u DHA/μg N (enrichissement par rapport au suc : 100 x) ;
— cortisone-sulfatase : 200-500 u COR/μg N (enrichissement par rapport au suc : 100 x).

(NC : nitrocatéchol ; DHA : déhydroépiandrostérone ; COR : cortisone)

Elle a une teneur de 10 % d'azote.

Elle est riche en glucides : hexoses : 18,6 % ; 6-désoxyhexoses : 3,2 % ; osamines : 9,5 %.

Le rapport hexoses/N = 1,7 — 6-désoxyhexoses/N = 0,29.

IV. — L'étude cinétique de l'hydrolyse des stéroïdes-sulfates et du cortisone 21-sulfate permet de conclure à l'identité de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase.

En effet, l'expérience montre une compétition de ces différents substrats entre eux vis-à-vis de l'enzyme.

Quantitativement, on retrouve la même constante d'affinité du sulfate de déhydroépiandrostérone pour l'enzyme, soit par la détermination de la constante de Michaelis, soit par celle de la constante d'inhibition, lorsqu'il intervient comme inhibiteur compétitif dans l'hydrolyse du cortisone 21-sulfate.

L'analyse des constantes cinétiques et thermodynamiques donne quelques informations sur l'association enzyme-substrat et les facteurs stériques qui déterminent cette association d'une part et sur la décomposition de ces complexes d'autre part.

Les stéroïdes-sulfates de la série trans (5 α) semblent avoir une affinité beaucoup plus grande pour l'enzyme que les composés de la série cis (5 β). Les constantes de Michaelis varient en moyenne dans un rapport 100, toutefois les valeurs de k_s sont d'un ordre de grandeur assez peu différent. Les composés trans ont donc une structure beaucoup plus favorable à la fixation de l'enzyme que les composés cis.

L'enzyme n'exerce aucune action hydrolysante sur les stéroïdes-sulfates en 3 α des composés 5 α, mais ceux-ci peuvent se fixer sur l'enzyme puisqu'ils interviennent comme inhibiteurs de l'hydrolyse du sulfate de déhydroépiandrostérone. L'inhibition est non compétitive, ces esters sulfates ne se fixent pas sur les centres actifs de l'enzyme, probablement par suite de leur configuration stéréochimique inadéquate.

Les stéroïdes-sulfates où le sulfate est en 17 β ne sont pas hydrolysés, bien qu'ils se fixent sur les centres actifs de l'enzyme avec une affinité du même ordre de grandeur que les substrats. Il est possible que, dans ce cas, la répartition des charges soit telle que l'activation du complexe ne puisse se faire.

Les valeurs obtenues pour l'énergie d'activation sont peu différentes pour les différents substrats. Leur ordre de grandeur est celui que l'on trouve dans la littérature pour l'hydrolyse enzymatique des liaisons esters. Ces valeurs ne peuvent rendre compte de la grande différence de vitesse d'hydrolyse du cortisone 21-sulfate et des stéroïdes-sulfates portant le groupement sulfate en 3 β ou 3 α. Cette différence est peut-être liée à un effet d'entropie. Le groupement sulfate en position terminale possèderait une liberté beaucoup plus grande de mouvement.

Il est impossible de calculer les valeurs de ΔF^* et ΔS^* correspondant aux différentes réactions tant que l'enzyme n'est pas totalement purifié.

Le résultat le plus positif que nous apportons est celui de l'identité de la stéroïde-sulfatase et de la cortisone-sulfatase, il reste encore à déterminer si l'arylsulfatase est un enzyme différent ou le même enzyme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Andersen (S.O.). — *Acta Chem. Scand.*, 1959, **13**, 120-126.
2. Ammon (R.) et Ney (K.H.). — *Arch. Bioch. Bioph.*, 1957, **69**, 179-185.
3. Ammon (R.) et Ney (K.H.). — *Hoppe Seyler Ztsch. f. Phys. Chem.*, 1959, **314**, 240-244.
4. Auger (L.) et Boussier (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **40**, 1379.
5. Baum (H.) et Dodgson (K.S.). — *Nature, Lond.*, 1957, **179**, 312-313.
6. Bernfeld (P.) et Fishman (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **202**, 757.
7. Billett (F.). — *Biochem. J.*, 1954, **57**, 159-162.
8. Bloch (E.) et Gibree (N.B.). — *Arch. Biochem. Bioph.*, 1959, **79**, 307-322.
9. Bourrillon (R.) et Got (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, **38**, 1165.
10. Boussier (G.). — *Thèse de dostorat ès sciences,* Paris, 1960.
11. Brown (J.B.). — *Biochem. J.*, 1955, **60**, 2, 185-193.

11 *bis*. Burnstein (S.) et Lieberman (S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 5235.

12. Cohn (E.J.), Heyroth (F.F.) et Menkin (M.F.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 696-714.
13. Collin (M.) et Lemoyne (S.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1940, **211**, 44-47.
14. Crépy (O.), Garrone (G.) et Jayle (M.F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, **34**, 1183-1199.
15. Dische (Z.) et Shettles (L.B.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **175**, 595.
16. Dodgson (K.S.). — *Enzymologia,* 1959, XX, 6, 301-312.
17. Dodgson (K.S.). — *Biochem. J.*, 1961, **78**, 324-333.
18. Dodgson (K.S.), Lewis (J.I.M.) et Spencer (B.). — *Biochem. J.*, 1953, **55**, n° 2, 253-259.
19. Dodgson (K.S.) et Llyod (A.G.). — *Biochem. J.*, 1957, **66**, 532.
20. Dodgson (K.S.) et Llyod (A.G.). — *Biochem. J.*, 1958, **68**, 88.
21. Dodgson (K.S.), Llyod (A.G.) et Spencer (R.B.). — *Biochem. J.*, 1957, **65**, 131.

22. Dodgson (K.S.) et Powell (G.M.). — *Biochem. J.*, 1959, **73**, 666-679.

23. Dodgson (K.S.), Rose (F.A.) et Spencer (B.). — *Biochem. J.*, 1957, **66**, 357-363.

24. Dodgson (K.S.), Rose (F.A.) et Spencer (B.). — *Biochem. J.*, 1957, **66**, 363-368.

25. Dodgson (K.S.) et Spencer (B.). — *Biochem. J.*, 1953, **55**, n° 2, 315-320.

26. Dodgson (K.S.) et Spencer (B.). — *Biochem. J.*, 1953, **55**, 436-440.

26 *bis*. Dodgson (K.S.) et Spencer (B.). — *Biochem. J.*, 1954, **57**, 310-315.

27. Dodgson (K.S.) et Spencer (B.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 175.

28. Dodgson (K.S.), Spencer (B.) et Thomas (J.). — *Biochem. J.*, 1954, **57**, Part. 3, xxi.

29. Dodgson (K.S.), Spencer (B.) et Williams (K.). — *Biochem. J.*, 1955, **61**, n° 3, 374-380.

30. Dodgson (K.S.), Spencer (B.) et Williams (K.). — *Biochem. J.*, 1955, **62**, Part 1, 5P.

31. Dodgson (K.S.), Spencer (B.) et Williams (K.). — *Biochem. J.*, 1956, **64**, 216.

32. Dumazert (Ch.) et Marcelet (Y.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 201.

33. Dzialoszynski (L.M.). — *Nature, Lond.*, 1950, **166**, 157.

34. Eadie (G.S.). — *Science*, 1952, **116**, 688.

35. Egami (F.) et Itabashi (M.). — *Chem. Abst.*, 1951, **45**, 10278 c.

36. Ehrlich (F.). — *Biochem. Z.*, 1932, **250**, 525.

37. Ellis (S.) et Simpson (M.E.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, **220**, 939.

38. Elson (L.A.) et Morgan (W.T.J.). — *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1834.

39. Emilliozzi (R.). — *Bull. Soc. Chim. de France*, 1960, **172**, 911.

40. Fishman (W.H.), Springer (B.) et Brunetti (R.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 449.

41. Flodin (P.) et Kupke (D.W.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 368.

42. Flodin (P.) et Porath (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **13**, 175.

43. Fromageot (C.). — *Ergeb. Enzyforsch.*, 1938, **7**, 50.

44. Gautheret (R.J.). — La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation. (Paris, Masson éd., 1959.)

45. Gedin (H.) et Porath (J.). — *Biochim. Biophys. Acta,* 1957, **26**, 159.

46. Gibian (H.) et Bratfisch (G.). — *Hoppe Seyler Z. physiol. Chem.,* 1956, **305**, 266.

47. Gibson (K.D.). — *Biochim. Biophys. Acta,* 1956, **22**, 72.

48. Gomori (G.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.,* 1948, **68**, 354.

49. Goodwin (T.W.) et Morton (R.A.). — *Biochem. J.,* 1946, **40**, 628.

50. Gornall (A.G.) et Mac Donald (M.F.). — *J. Biol. Chem.,* 1953, **201**, 279.

51. Hakkinen (I.P.T.). — *Nature,* 1960, **186**, 232.

52. Harada (T.) et Kono (K.). — *J. Agr. Chem. Soc. Jap.,* 1954, **28**, 608.

53. Henry (R.) et Thévenet (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1952, **34**, 886-896.

54. Henry (R.), Thévenet (M.) et Jarrige (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1952, **34**, 897-899.

55. Huggins (Ch.) et Talalay (P.). — *J. Biol. Chem.,* 1945, **159**, 399-410.

56. Jarrige (P.) et Henry (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1952, **34**, 9, 872-885.

57. Jayle (M.F.) et Baulieu (E.E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1954, **36**, 1391.

58. Kent (P.W.) et Whitehouse (M.W.). — *Analyst,* 1955, **80**, 630.

59. Lebreton (Ph.). — *Bull. Soc. Chim. France,* 1960, **11-12**, 2188.

60. Leon (A.), Bulbrook (R.D.) et Corner (E.D.S.). — *Biochem. J.,* 1960, **75**, 612-617.

61. Lison (L.). — Statistique appliquée à la biologie expérimentale. (Gauthier-Villars éd., 1958.)

62. Lowry (O.H.), Rosenbrouch (N.J.), Farr (A.L.) et Randall (R.J.). — *J. Biol. Chem.,* 1951, **193**, 265.

63. Markham (R.). — *Biochem. J.,* 1942, **36**, 790.

64. Michon (J.) et Bourrillon (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1959, **41**, 277-282.

65. Moretti (J.), Boussier (G.) et Jayle (M.F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1958, **40**, 59.

66. Nagaoka (T.). — *Tohoku J. Exp. Med.,* 1951, **53**, 29.

67. Nakada (H.I.) et Wolfe (J.B.). — *Arch. Biochem. Biophys.,* 1961, **94**, 244-251.

68. Nelson (N.). — *J. Biol. Chem.,* 1944, **153**, 375.

69. Neuberg (C.) et Hofmann (E.). — *Biochem. Z.,* 1931, **234**, 345.

70. Neuberg (C.) et Kurono. — *Biochem. Z.*, 1923, **140**, 295.

71. Neuberg (C.) et Rubin (O.). — *Biochem. Z.*, 1914, **67**, 82.

72. Neuberg (C.) et Schoenebeck (O.). — *Biochem. Z.*, 1933, **265**, 223.

73. Neuberg (C.) et Wagner (J.). — *Biochem. Z.*, 1925, **161**, 492.

74. Neuberg (C.) et Wagner (J.). — *Z. Ges. Exptl. Med.*, 1927, **53**, 334.

75. Ochoa, in Colowick (S.P.) et Kaplan (N.O.). — Acad. Press, N.Y., 1955, vol. I, p. 737.

76. Official methods of analysis of Association of Agricultural Chemists Publ. by the Assoc. 8e édit. Washington 4 D.C., 1955, pp. 861-863.

77. Pasqualini (J.R.), Zelnik (R.) et Jayle (M.F.). — *Anal. Biochem.* (sous presse).

78. Payza (A.N.) et Korn (E.D.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1956, **20**, 596.

79. Peterson (E.A.) et Sober (H.A.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 751-755.

80. Pincus (P.). — *Nature*, Lond., 1950, **66**, 187.

81. Pulkkinen (M.O.). — *Acta Physiol. Scand.*, 1961, **52**, suppl. 180.

82. Reese (E.T.), Clapp (R.C.) et Mandels (M.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **75**, 228.

83. Rimington (A.). — *Biochem. J.*, 1940, **34**, 931.

84. Ringbom (A.). — *Ztschr. Anal. Chem.*, 1939, **115**, 332.

85. Roy (A.B.). — *Biochem. J.*, EPTA, **53**, 12-15.

86. Roy (A.B.). — *Biochem. J.*, 1953, **55**, 653-661.

87. Roy (A.B.). — *Biochem. J.*, 1954, **57**, 465-470.

88. Roy (A.B.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1954, **15**, 300.

89. Roy (A.B.). — *Biochem. J.*, 1956, **62**, 41-50.

90. Roy (A.B.). — *Biochem. J.*, 1956, **64**, 651.

91. Roy (A.B.). — *Biochem. J.*, 1957, **66**, 700.

92. Roy (A.B.). — Adv. in Enz. Inter. Publ. N.Y., Lond., vol. XXII, p. 205.

93. Savard (K.), Bagnoli (E.) et Dorfman (R.I.). — *Federation Proc.*, 1954, **13**, 289.

94. Sher (I.H.). — *Anal. Chem.*, 1955, **27**, 831-832.

95. Smith (J.N.). — *J. Chem. Soc.*, 1951, IV, 2861-2863.

96. Smithies (K.). — *Biochem. J.*, 1955, **61**, 629.

97. Sobel (A.E.) et Spoerrs (P.E.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 1, 1259.

98. Soda (T.). — *J. Fac. Sc. Univ. Tokyo,* 1936, Sec. I, 3, 149.

99. Soda (T.) et Hattori (C.). — *Bull. Chem. Soc. Japan,* 1931, **6**, 258.

100. Soda (T.) et Hattori (C.). — *Bull. Chem. Soc. Japan,* 1934, **9**, 83.

101. Soda (T.) et Hattori (C.). — *Proc. Imp. Acad. Tokyo,* 1931, **7**, 269.

102. Somogyi (M.). — *J. Biol. Chem.,* 1945, **160**, 61.

103. Spencer (B.). — *Biochem. J.,* 1960, **75**, 3, 435.

104. Stedman (E.), Stedman (E.) et Easson (L.H.). — *Biochem. J.,* 1931, **25**, 1147.

105. Stitch (S.R.) et Halkerston (I.D.K.). — *Nature,* Lond., 1954, **172**, 398.

106. Suzuki (S.), Takahashi (N.) et Egami (F.). — *J. Biochem. Tokyo,* 1959, **46**, 1-10.

107. Takahashi (N.). — *J. Biochem. Tokyo,* 1960, **47**, 230.

108. Takahashi (N.). — *J. Biochem. Tokyo,* 1960, **48**, 508.

108 *bis.* Takahashi (N.) et Egami (F.). — *Biochem. Biophys. Acta,* 1960, **38**, 375.

109. Talalay (P.), Fishman (W.H.) et Huggins (Ch.). — *J. Biol. Chem.,* 1946, **166**, 757.

110. Tanko (B.). — *Biochem. Z.,* 1932, **247**, 486.

111. Utusi (M.), Huzi (K.), Matumoto (S.) et Nagaoka (T.). — *Tohoku J. Exp. Med.,* 1949, **50**, 175.

112. Vlitos (A.J.). — Contribs. Boyce Thompson Inst., 1953, **17**, 127.

113. Wakabayashi (M.) et Fishman (W.H.). — *Biochim. Biophys. Acta,* 1961, **48**, 195-197.

114. Waley (S.G.) et Watson (J.). — *Biochem. J.,* 1953, **55**, 328.

115. Webb (E.C.) et Morrow (F.W.). — *Biochem. J.,* 1959, **73**, 7-15.

116. Webb (E.C.) et Morrow (F.W.). — *Biochem. Biophys. Acta,* 1960, **39**, n° 3, 542.

117. Weimer (H.E.) et Moshin (J.R.). — *Am. Rev. Tuberculosis,* 1952, **68**, 594.

118. Weinmann (S.H.) et Jayle (M.F.). — Analyse des stéroïdes hormonaux. Jayle (M.F.). Masson éd., 1961.

119. Whitehead (J.E.M.), Morrisson (A.R.) et Young (G.L.). — *Biochem. J.,* 1952, **51**, 585-594.

120. Yon (J.). — *Thèse de Doctorat ès Sciences,* Paris, 1955.

121. Zelnik (R.), Desfosses (B.) et Emiliozzi (R.). — *C.R. Ac. Sc.,* 1960, **250**, 1671-1673.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 9

TRAVAUX ANTERIEURS 11

— Les sulfatases 11
— Les sulfatases du suc digestif d' « Helix pomatia » 15

CHAPITRE 1 : MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES 17

A. Substrats 17
1° *Pour la β-glucuronidase* 17
2° *Pour l'arylsulfatase* 18
3° *Pour la stéroïde-sulfatase* 18
4° *Pour la cortisone-sulfatase* 19

B. Mesure de l'activité 19
1° *Hydrolyse - Mode opératoire commun - Unité d'activité* . . 20
2° *β-glucuronidase* 22
3° *Arylsulfatase* 22
4° *Stéroïde-sulfatase* 29
5° *Cortisone-sulfatase* 32
6° *Dosage des esters-sulfates* 35
7° *Dosage des ions* SO_4^{2-} 38

C. Dosage des protéines 39
1° *Microkjeldahl* 39
2° *Dosage colorimétrique* 41
3° *Dosage par mesure de l'absorption dans l'U.V.* 41

CHAPITRE 2 : FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU SHP 42

A. Matière première 42
1° *Prélèvement* 42
2° *Action du pH* 43
3° *Action de la température* 44
4° *Action des solvants* 45
5° *Action des sels minéraux* 46

B. Fractionnement par les sels minéraux 49
1° *Choix du sel* 49
2° *Action du sulfate d'ammonium en fonction du pH* 49

C. Fractionnement par l'acétone 58
1° *Action du pH* 58
2° *Action de la dilution* 59
3° *Méthode utilisée* 59

D. Fractionnement par l'éthanol 61
1° *Fractionnement direct du SHP par l'éthanol* 61
2° *Fractionnement par l'éthanol de la fraction 60-70 % de saturation en sulfate d'ammonium* 64
3° *Fractionnement par l'éthanol des fractions acétoniques actives* 65

E. Adsorbants 66
1° *Phosphate de calcium* 66
2° *Diéthylaminoéthylcellulose* 68

CHAPITRE 3 : ESSAIS DE SEPARATION DES SULFATASES 70

A. Chromatographie 70
1° *Gradient exponentiel* 71
2° *Gradient linéaire* 73

B. Electrophorèse 76
1° *Electrophorèse sur papier* 76
2° *Electrophorèse de zone* 77
3° *Electrophorèse en gel d'amidon* 83

C. Méthode de préparation des sulfatases 90
1° *Fractionnement par l'acétone à — 10°C* 90
2° *Fractionnement par l'éthanol à — 10°C* 90
3° *Chromatographie sur DEAE-cellulose* 91

D. Nature des protéines actives 92

CHAPITRE 4 : SPECIFICITE DES SULFATASES. ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES ESTERS-SULFATES 97

A. Stéréochimie des stéroïdes sulfates étudiés 97
— *Spécificité des sulfatases du SHP* 103

B. Etude cinétique de l'hydrolyse des esters-sulfates 105
Matériel et méthodes 105
1° *Matériel* 105
2° *Techniques expérimentales* 106
Etude cinétique de la réaction d'hydrolyse des esters-sulfates . . 108
1° *Arylsulfates* 112
2° *Stéroïdes-sulfates* 114
Etude thermodynamique de l'hydrolyse des esters-sulfates 131

CONCLUSIONS 137

RESUME 141

BIBLIOGRAPHIE 145

IMPRIMERIE R. FOULON & CIE, 29. RUE DEPARCIEUX, PARIS XIV^e

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Polysaccharides sulfates dans le règne animal à l'exclusion des Héparine-Sulfates

Vu et approuvé :
Paris, le 23 janvier 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN ROCHE